

Université de Sherbrooke

**Régulation par l'insuline de la physiologie pancréatique de la
somatostatine chez le rat**

Par
Sofi Julien
Département de médecine, Service de gastro-entérologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine
En vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.) en biologie cellulaire

Été 2004



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 0-494-00199-2

Our file Notre référence

ISBN: 0-494-00199-2

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

A Papa,

A Maman,

Cette thèse est en quelque sorte ma revanche.

Vous seuls pouvez comprendre ce que cela

représente pour moi...

TABLE DES MATIÈRES.....	ii
LISTE DES ILLUSTRATIONS.....	v
ABRÉVIATIONS.....	vi
RÉSUMÉ	viii

I- INTRODUCTION..... 1

1- LE PANCRÉAS.....1

1-1 Situation anatomique et aspect macroscopique.....1

1-2 Les deux composantes glandulaires du pancréas.....3

1-3 Les étapes du développement du pancréas.....5

1-3-1 Morphogenèse pancréatique.....6

1-3-2 Spécification du champ morphogénétique pancréatique.....6

1-4 Ontogenèse du pancréas endocrine.....9

2- PHYSIOLOGIE DU PANCRÉAS ENDOCRINE.....13

2-1 Principe d'endocrinologie.....13

2-2 L'îlot de Langerhans.....14

2-3 L'insuline.....16

2-3-1 Découverte.....16

2-3-2 L'hormone.....18

2-3-3 Mécanismes de sécrétion de l'insuline.....20

2-3-4 Les récepteurs de l'insuline et leurs voies de signalisation.....	22
a- Les récepteurs de l'insuline.....	23
b- La voie de la PI-3 Kinase.....	25
c- La voie MAPKinase.....	30
d- Voie mettant en jeu les protéines G.....	31
2-3-5 Rôle de l'insuline sur la sécrétion de la somatostatine pancréatique.....	33
2-4 La somatostatine.....	34
2-4-1 Distribution.....	35
2-4-2 Gène et produits du gène de la somatostatine.....	36
2-4-3 Régulation de l'expression de la somatostatine pancréatique.....	38
2-4-4 Effets physiologiques de la somatostatine.....	43
2-5 Pathologie de l'îlot de Langerhans : le diabète.....	46
2-5-1 Les types de diabète.....	46
2-5-2 Métabolisme glucidique et lipidique au cours du diabète.....	48
2-5-3 Altération de la physiologie pancréatique de la somatostatine au cours du diabète.....	49
3- MODÈLES D'ÉTUDES.....	51
3-1 Modèles animaux.....	51
3-2 Modèles cellulaires.....	53
4- PROBLÉMATIQUES ET OBJECTIFS.....	55

II- MATÉRIELS ET MÉTHODES/ III- RÉSULTATS.....	57
ARTICLE 1.....	57
<p>Julien S, Laine J, Morisset J. Letter to the editor : modified technique to isolate pancreatic islets from diabetic rats after its induction by streptozotocin. <i>Pancreas</i>. 27: 206-7, 2003.</p>	
ARTICLE 2.....	64
<p>Julien S, Laine J, Morisset J. The rat pancreatic islets a reliable tool to study islet responses to cholecystokinin receptor occupation. <i>Reg. Pept.</i> (Sous presse).</p>	
ARTICLE 3.....	93
<p>Sophie Julien, Jean Laine and Jean Morisset. Regulation of rat pancreatic CCK_B receptor and somatostatin expression by insulin. <i>Diabetes</i> 53: 2004 (Sous presse).</p>	
ARTICLE 4.....	123
<p>Sofi Julien, Jean Laine and Jean Morisset. Insulin inhibits somatostatin expression and contents in RIN-14B cells : a cAMP signaling pathway involved? <i>Diabetes</i> (Soumis).</p>	
IV- DISCUSSION GÉNÉRALE.....	153
V- CONCLUSIONS.....	172
VI- PERSPECTIVES.....	177
VII- REMERCIEMENTS.....	182
VIII- RÉFÉRENCES.....	185

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Situation anatomique et aspect macroscopique du pancréas.....	2
Figure 2 : Histologie du pancréas exocrine humain.....	4
Figure 3 : Développement du pancréas.....	7
Figure 4 : Histologie des étapes du développement de l'îlot de Langerhans.....	12
Figure 5 : L'îlot de Langerhans.....	15
Figure 6 : Vascularisation intrinsèque de l'îlot de Langerhans.....	17
Figure 7 : L'insuline.....	19
Figure 8 : Mécanisme de sécrétion de l'insuline.....	21
Figure 9 : Modes d'action de l'insuline.....	24
Figure 10 : Gène et produits du gène de la somatostatine.....	37
Figure 11: Modèle hypothétique de la voie insulinique sur le contrôle de l'expression du gène de la SS pancréatique.....	176
Figure 12 : Perspectives pour l'étude de la voie insulinique sur le contrôle de l'expression du gène de la SS pancréatique.....	180

ABRÉVATIONS

AC	: Adenylate cyclase
ADP	: Adenosine diphosphate
ARN	: Acide ribonucléique
ARNm	: Acide ribonucléique messenger
ATP	: Adénosine triphosphate
CRE	: cyclic AMP response element
CREB	: cyclic AMP response element binding protein
ERK	: Extracellular signal-regulated kinase
FGF	: Fibroblast growth factor
GDP	: Guanosine diphosphate
GK	: Glucokinase
GLUT	: Transporteur du glucose
Grb	: Growth factor receptor binding protein
GSK	: Glycogen synthase kinase
GTP	: Guanosine triphosphate
IDX-1	: Islet/duodenum homeobox-1
IGF	: Insulin-like growth factor
IPF-1	: Insulin promoter factor-1
IRS	: Insulin receptor substrate
K	: Potassium

MAPK	: Mitogen-activated protein kinase
mTOR	: mammalian target of rapamycin
PDE	: Phosphodiesterase
PDK	: Phosphoinositide-dependant protein kinase
PDX-1	: Pancreatic and duodenal homeobox factor 1
PEPCK	: Phosphoenolpyruvate carboxy kinase
PI3-K	: Phosphatidyl inositol 3-Kinase
PKA	: Protein kinase A
PKB	: Protein kinase B
PKC	: Protein kinase C
PP	: Polypeptide pancréatique
RTK	: Récepteur tyrosine kinase
RT-PCR	: Reverse transcription and polymerization chain reaction
SH	: Src homology
SMS-UE	: Somatostatin-gene upstream element
SNC	: Système nerveux central
SNP	: Système nerveux périphérique
SS	: Somatostatine
SST	: Récepteur de la somatostatine
STF-1	: Somatostatin transactivating factor
STZ	: Streptozotocine
TSE	: Tissue-specific element

RÉSUMÉ

De nombreuses études ont démontré des changements dans le métabolisme de la somatostatine (SS) pancréatique au cours du diabète chez l'humain et chez des modèles animaux expérimentaux. Cependant les résultats sont à ce jour contradictoires, puisque dans certaines études l'expression du messenger et les contenus de la SS pancréatique sont augmentés alors qu'ils sont diminués dans d'autres études. De plus, le rôle de l'insuline sur la sécrétion de la SS pancréatique reste lui aussi ambigu. Des études ont en effet montré un effet soit inhibiteur, soit stimulateur, d'autres ont aussi démontré que l'insuline pouvait n'avoir aucun effet sur la sécrétion de la SS pancréatique. Dans tous les cas, jamais aucun mécanisme n'a été mis en évidence, ni même suggéré pour expliquer l'un ou l'autre des résultats observés.

Dans cette étude nous avons effectué une étude *in vivo* sur des rats d'une part, et *in vitro* à partir d'îlots purifiés de rats et de cellules RIN-14B produisant la SS d'autre part. Pour les études *in vivo* et *in vitro* impliquant l'utilisation des rats, nous avons travaillé à partir de 4 groupes d'animaux : contrôles, diabétiques induits par la streptozotocine, diabétiques induits par la streptozotocine traités à l'insuline, et diabétiques induits par la streptozotocine traités à l'insuline suivit d'une interruption du traitement pendant 21 jours.

L'ensemble de ces études a eu pour but de démontrer d'une part que les îlots de Langerhans purifiés de pancréas normal ou diabétique étaient un bon modèle pour l'étude de la physiologie de la SS pancréatique *in vivo* et *in vitro*. Nous avons démontré que l'expression et les contenus de la SS pancréatique augmentaient significativement au

cours du diabète, qu'un traitement à l'insuline ramenait aux valeurs contrôles l'expression et les contenus de la SS. Finalement, un arrêt de ce traitement ramenait l'expression et les contenus en SS comparables à l'état de diabète initial. D'autre part, l'étude *in vitro* sur une lignée cellulaire produisant la somatostatine, RIN-14B, a permis de mettre en évidence que l'effet négatif de l'insuline était directement dépendant de sa concentration et du temps d'incubation sur l'expression du messenger et des contenus de la SS mais totalement indépendant de la concentration de glucose. Finalement, l'effet négatif de l'insuline sur l'expression de la SS pancréatique requiert la synthèse *de novo* d'au moins un facteur protéique. De plus, il est probablement médié par une voie mettant en jeu le couplage d'une protéine Gi avec le récepteur à tyrosine kinase de l'insuline, suggérant ainsi l'implication d'une voie dépendante de l'AMPc.

I- INTRODUCTION

L'objet de cette étude a été de déterminer le rôle de l'insuline sur la physiologie pancréatique de la somatostatine qui comprend entre autres, la régulation de son expression et de sa sécrétion, ainsi que les voies de signalisation empruntées pour aboutir à ses effets. Afin de bien comprendre les démarches utilisées au cours de cette recherche et l'intérêt de cette étude, nous nous sommes donc efforcés de décrire et résumer le plus justement possible tous les aspects qui ont permis l'élaboration de ce travail.

1- Le pancréas

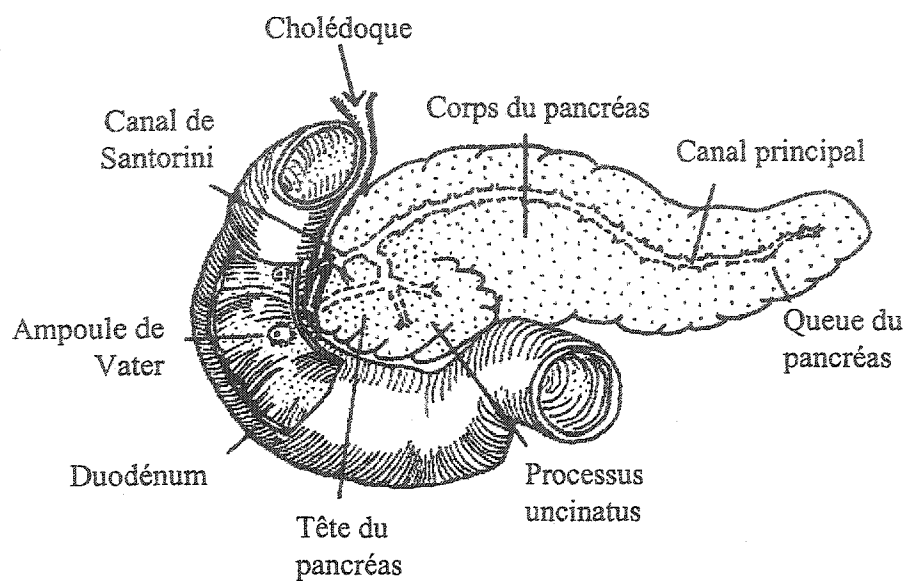
1-1 Situation anatomique et aspect macroscopique

Le pancréas est un organe intra abdominal profond, bien délimité et situé en position rétro péritonéale dans la partie supérieure gauche qui surplombe le rachis lombaire. Chez l'humain adulte, il est divisé en 4 segments anatomiques, à savoir la tête et l'isthme, de formes grossièrement quadrilatères littéralement encastrés dans le cadre duodénal, le corps irrégulier et allongé, enfin la queue qui se prolonge jusqu'au rebord gastrique du hile de la rate (Fig.1A).

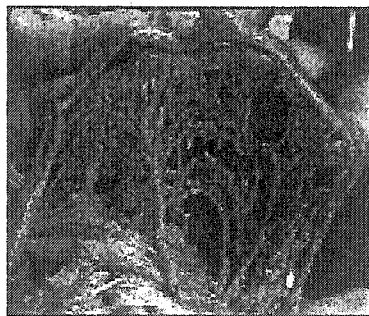
Il est recouvert par un mince tissu conjonctif qui s'invagine dans le parenchyme glandulaire le divisant en lobules. Les travées conjonctives interlobulaires contiennent des vaisseaux, des nerfs et des canaux excréteurs interlobulaires. Les canaux d'abord intercalaires deviennent intralobulaires, puis

Figure 1 : Situation anatomique et aspect macroscopique du pancréas. A. Le pancréas est un organe mou très bien délimité chez l'homme en contact anatomique avec l'estomac et le 3^{ème} duodénum. B. Chez les rongeurs, ici le rat, le pancréas est un organe diffus en étroite relation avec l'ensemble du tube digestif, l'estomac, la rate et le foie. Photo personnelle.

A.



B.



interlobulaires qui se réunissent en canaux collecteurs jusqu'au canal de Wirsung ou canal pancréatique principal parcourant toute la glande selon son grand axe. Il rejoint le canal cholédoque en un point qui forme un bulbe au niveau du deuxième duodénum, appelé ampoule hépato-pancréatique dite de Vater (Fig. 1A).

Chez les rongeurs, le pancréas est un organe mou et diffus étroitement associé à l'ensemble des organes abdominaux (estomac, tube digestif, rate, et foie) (Fig.1B). Il présente cependant les mêmes caractéristiques macroscopiques décrites précédemment chez l'humain.

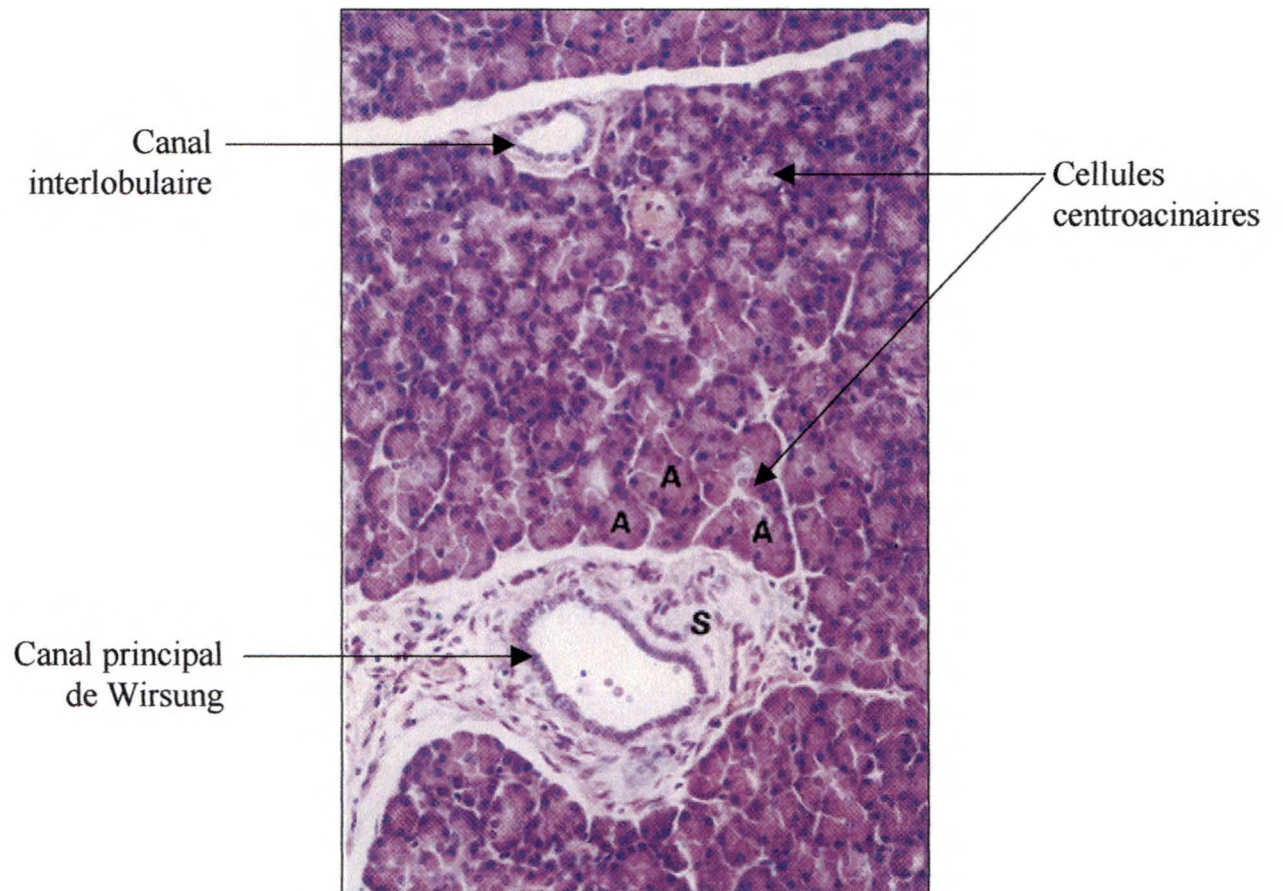
1-2 Les deux composantes glandulaires du pancréas

Le pancréas est constitué de deux tissus histologiquement et fonctionnellement différents pourtant étroitement liés anatomiquement, l'un exocrine et l'autre endocrine.

Le pancréas exocrine :

Le pancréas exocrine est une glande à structure acinaire qui comprend deux types de tissus : l'épithélium acinaire et l'épithélium canalaire (décrit précédemment) qui représentent 94 % et 3 % du volume de la glande respectivement (Fig. 2). Les cellules acinaires synthétisent et exportent les enzymes dans la lumière du duodénum au niveau de l'ampoule hépato-pancréatique dite de Vater. Elles sont nécessaires à la digestion des lipides, hydrates de carbone et protéines en nutriments facilement

Figure 2 : Histologie du pancréas exocrine humain. La majorité du tissu exocrine est composé d'acini (A). Chaque acinus est composé de 2 à 20 cellules pyramidales et est drainé par un ductule ou canal interlobulaire qui se jette dans des canaux de taille de plus en plus grande. Le canal interlobulaire et le canal principal entouré d'un tissu conjonctif de soutien (S). Tiré de Young et Heath dans *Weather's functional histology*, 2000. Edition Churchill Livingstone.



assimilables pour les cellules de l'organisme. Les cellules canalaire responsables de la sécrétion hydrocarbonatée assurent l'exportation des enzymes digestives et le maintien d'un pH favorable permettant leur activité optimale (Lévy, 1998).

Le pancréas endocrine :

L'unité fonctionnelle de la composante endocrine du pancréas est représentée par les îlots de Langerhans disséminés dans le parenchyme exocrine. Ils représentent environ 3 % du volume du pancréas. Le pancréas endocrine est responsable du maintien de l'homéostasie glucidique en co-ordonnant l'utilisation du glucose par les cellules de l'organisme par l'effet synergique de l'insuline et du glucagon qui agissent *via* le sang.

La physiologie du pancréas endocrine est exhaustivement détaillée dans la partie 2 de ce chapitre intitulé : Physiologie de pancréas endocrine.

1-3 Les étapes du développement du pancréas

La dissection de l'ontogenèse pancréatique a débuté à la fin des années 1960. Cependant, grâce aux nouvelles techniques de culture cellulaire, biologie moléculaire, et l'avancée dans l'utilisation d'animaux transgéniques, la biologie du développement a connu un essor considérable au cours des années 1990. Ainsi, les étapes du développement du pancréas commencent maintenant à être bien connues autant d'un point de vue morphogénétique que moléculaire. L'étude de l'ontogenèse pancréatique représente une étape essentielle visant à développer une thérapie cellulaire pour le

diabète. Les paragraphes suivants vont donc décrire les grandes étapes du développement du pancréas, et plus particulièrement celles du pancréas endocrine.

1-3-1 Morphogenèse pancréatique

L'organogenèse du pancréas est semblable chez tous les mammifères. Cependant, en raison des temps de gestation différents selon les espèces (21 jours chez les rongeurs, 270 jours chez l'homme, et même 660 jours chez l'éléphant!) les étapes de la morphogenèse varient séquentiellement et temporellement. Le pancréas se développe à partir de deux diverticules endoblastiques, un premier dorsal suivi par un second ventral qui bourgeonnent sur l'intestin primitif (Edlund, 1998; St Onge et al., 1999). Le bourgeon pancréatique ventral migre vers le bourgeon dorsal (lors de la rotation du duodénum et de l'estomac) pour se fusionner avec lui et constituer ainsi le pancréas définitif (10.5 jours chez les rongeurs, 42 jours chez l'homme) (Fig.3A).

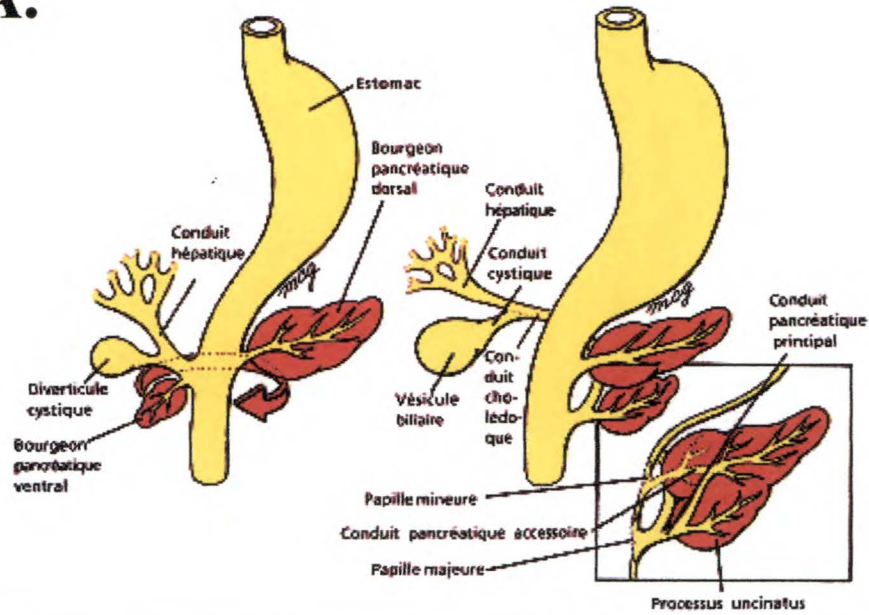
Le bourgeon pancréatique ventral donne naissance à la partie postérieure du pancréas et au processus uncinatus (petit pancréas), le bourgeon pancréatique dorsal est à l'origine de la tête, du corps et de la queue du pancréas définitif (Uchida et al., 1999). Lors de la fusion des deux bourgeons, seul le canalicule du bourgeon ventral persiste et devient le conduit pancréatique principal de Wirsung.

1-3-2 Spécification du champ morphogénétique pancréatique

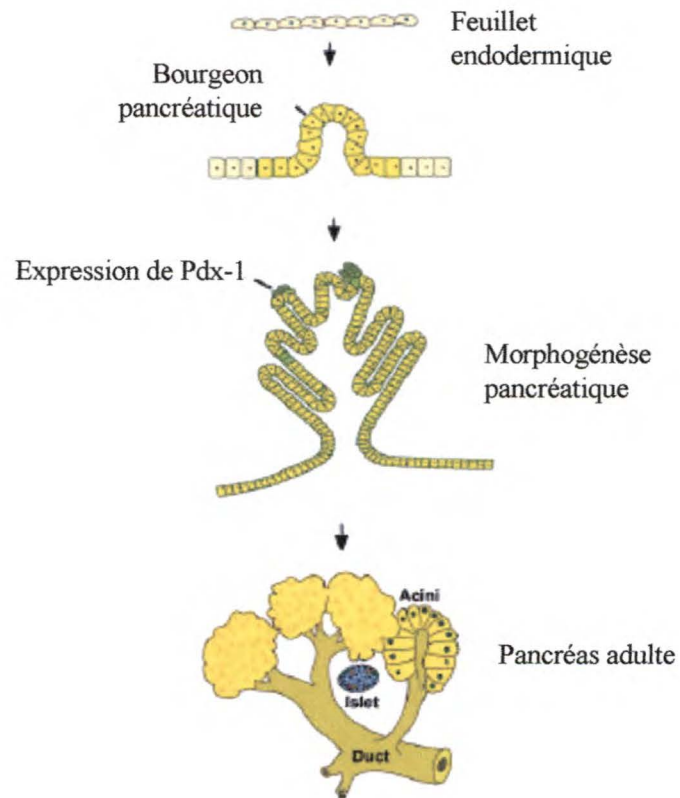
Les mécanismes moléculaires du développement du pancréas après maintes controverses sont actuellement bien connus et compris dans leur grande ligne. En effet, durant les années 1970, l'hypothèse sur l'origine embryonnaire du pancréas

Figure 3 : Développement du pancréas. **A.** Aspect macroscopique. Le bourgeon pancréatique dorsal puis le bourgeon pancréatique ventral se développent à partir de diverticules endoblastiques qui bourgeonnent sur l'intestin primitif. Le bourgeon pancréatique ventral migre autour du côté postérieur du duodénum et fusionne avec le bourgeon pancréatique dorsal. Tiré de Larssen. Embryologie humaine. 1996. Édition De Boeck Université. **B.** Aspect cellulaire. L'expression de Pdx-1 va initier la différenciation de cellules de l'épithélium de l'intestin primitif vers le lignage pancréatique endocrine. Les cellules prolifèrent, migrent hors des canaux, colonisent le parenchyme exocrine et se regroupent en grappes appelées aussi « clusters » pour former des îlots matures. Tiré et modifié de Wells, 2003.

A.



B.



suggérait que le neuroectoderme (en particulier les cellules des crêtes neurales) soit à l'origine du pancréas endocrine parce que celui-ci exprimait des marqueurs neuronaux. Actuellement il est bien établi que le pancréas tire son origine de cellules endo-mésodermiques grâce à une interaction épithélio-mésenchymateuse au niveau de l'intestin primitif (Scharfmann, 2000; Kim et al, 2001). La notochorde sous-jacente à l'endoderme joue un rôle primordial dans la spécification du pancréas. Elle induit l'expression des facteurs activine et FGF2 qui vont réprimer l'expression locale (dorsale et ventrale) de Sonic hedgehog (Shh) (Hebrok et al., 1998). L'absence locale de Shh induit l'expression de PDX-1 (pancreatic and duodenal homeobox effect, factor-1) dans l'endoderme permettant ainsi l'établissement du champ morphogénétique pancréatique à cet endroit. Ensuite, stimulées par les signaux du mésenchyme environnant, les cellules épithéliales présomptives prolifèrent au sein des bourgeons dorsal et ventral (Gittes et al. 1996). L'expression hiérarchique de facteurs de transcription spécifiques va ensuite initier la différenciation des cellules vers un lignage pancréatique acinaire, ductal ou endocrine (Edlund, 2001; Murtaugh and Melton, 2003; Kemp DM et al., 2003).

Des études récentes ont permis de déterminer que le contrôle du développement pancréatique impliquait les mêmes facteurs de transcription chez les rongeurs et chez l'homme. L'expression du facteur PDX-1 est primordial dans le développement du pancréas et tout particulièrement pour sa composante endocrine. En effet la mutation homozygote de PDX-1 aussi bien chez les rongeurs que chez l'homme entraîne une agénésie du pancréas (Offield et al., 1996; Stoffers et al., 1997; Jonsson et al. 2002;).

Jusqu'à la formation complète des îlots, les cellules endocrines prolifèrent, migrent hors de l'épithélium et colonisent le parenchyme exocrine sous forme de petits groupes de cellules appelés « clusters » puis finalement forment les îlots matures retrouvés chez l'adulte (Fig. 3B). Cependant, certaines modifications apparaissent lors de la période périnatale. Lors de notre étude (Article 2) nous avons comparé l'expression des hormones pancréatiques sur des îlots purifiés de fœtus humain, d'adulte humain et de rat. Le paragraphe suivant décrit donc brièvement les grandes lignes de l'ontogenèse de l'îlot de Langerhans chez ces deux espèces.

1-4 Ontogenèse du pancréas endocrine

Chez le rat

Le développement chronologique des quatre types cellulaires qui composent les îlots de Langerhans du rat a fait l'objet de nombreuses études immunohistochimiques. Toutes les études s'accordent sur le fait que le glucagon serait la première hormone à apparaître au jour 11 *post-coïtum* suivie de l'insuline 24 heures plus tard et enfin la somatostatine vers le 15^{ème} jour. Le polypeptide pancréatique apparaît seulement après la naissance (Fujii, 1979; Yoshinari et al., 1982; Yamaoka et al., 1999). L'expression des hormones est concomitante à l'expression de leur ARN messenger étudiée par RT-PCR (Gittes and Rutter, 1992). Cependant la proportion des cellules lors du développement fœtal n'est pas la même que celle observée à l'état adulte. En effet, McEvoy et Madson ont démontré que lors de la période périnatale, les cellules bêta et alpha proliféraient beaucoup à tel point que jusqu'au jour 6 après la naissance, les îlots représentaient 6% du volume du

pancréas, soit deux fois plus que dans le pancréas adulte mature. De plus, malgré leur petit nombre, les cellules delta augmentent leur nombre connu à l'état adulte tout juste après la naissance (McEvoy and Madson, 1980a et b; Komatsu et al, 1997).

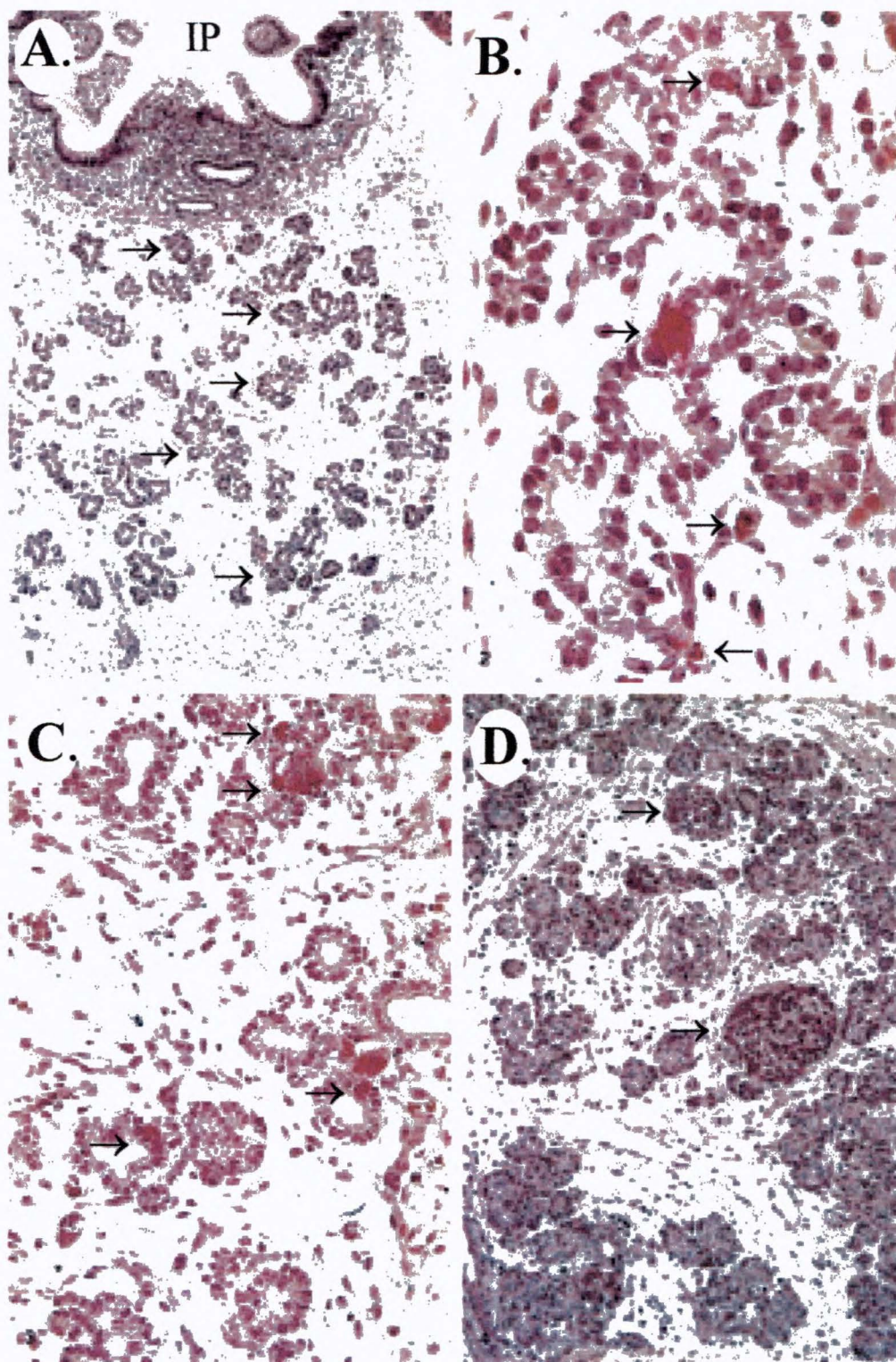
Chez l'humain

Toutes les études immunohistochimiques s'accordent sur le fait que l'insuline, le glucagon et la somatostatine sont présents à la 10ème semaine de développement. Cependant, il y a une controverse quant à l'apparition chronologique des trois hormones avant cette semaine. Certains auteurs suggèrent que l'insuline et la somatostatine sont les premières hormones exprimées (8^{ème} semaine) suivies du glucagon (12^{ème} semaine) et enfin plus tardivement du polypeptide pancréatique (19^{ème} semaine) (Stefan et al. 1983). D'autres suggèrent au contraire que la somatostatine et le polypeptide pancréatique seraient présents dès la 7^{ème} semaine de développement suivis du glucagon (8^{ème} semaine) et enfin de l'insuline (9^{ème} semaine) (Bocian-Sobkowska et al. 1997). Dans tous les cas, l'expression de la somatostatine est très élevée due à une très grande densité de cellules delta par rapport aux autres types cellulaires. C'est seulement à la naissance que la densité des autres cellules augmente et donc proportionnellement la densité des cellules delta diminue (Clark and Grant, 1983; Stefan et al. 1983, Rahier et al., 1980; Bocian-Sobkowska et al. 1997).

Même si l'ordre chronologique d'apparition des cellules pancréatiques endocrines diffère chez les espèces, cela n'empêche pas que le développement des îlots de Langerhans suive le même processus. Ici les étapes du développement des

îlots de Langerhans humains sont décrites en exemple mais le processus est le même chez le rat sur une échelle de temps plus courte (11^{ème} jour *post-coïtum* jusqu'à la naissance). Ainsi, le développement des îlots de Langerhans est actuellement divisé en quatre grandes étapes (Fig. 4). 1) semaines 9 et 10 : Apparition de cellules uniques exprimant une seule hormone dans la paroi épithéliale des canaux primitifs pancréatiques. 2) semaines 11 à 15 : Formation d'amas de 4 à 8 cellules appelés « clusters » tout près de la paroi des canaux. Les cellules commencent à migrer hors des canaux et colonisent le parenchyme. 3) semaines 16 à 29 : Les premiers îlots dits « zonulaires » sont présents dans le parenchyme. Leur composition est assez homogène, les cellules bêta sont centrales et en périphérie on retrouve les cellules alpha. Les cellules delta et PP sont encore rares au sein de l'îlot mais sont présentes sous forme de clusters. 4) 30 semaines à la naissance : les îlots acquièrent leur forme mature même si la densité des cellules qui les composent peut changer en période périnatale (Bocian-Sobkowska et al. 1997; Polak et al., 2000; Fowden and Hill, 2001).

Figure 4 : Les étapes du développement de l'îlot de Langerhans humain. A. Coupe de pancréas d'embryon humain composé majoritairement de petites structures canalaire (fléchées) à proximité de l'intestin primitif (IP). B. 9^{ème} semaine de gestation : des cellules isolées sécrétant une hormone (fléchées) sont présentes dans la paroi épithéliale des canaux primitifs. C. 10^{ème} semaine de gestation : Les cellules endocrines se regroupent au sein de clusters (fléchés) proches des canaux. D. 21^{ème} semaine de gestation : formation des îlots définitifs (fléchés). Tiré de Peters J et al., 2000.

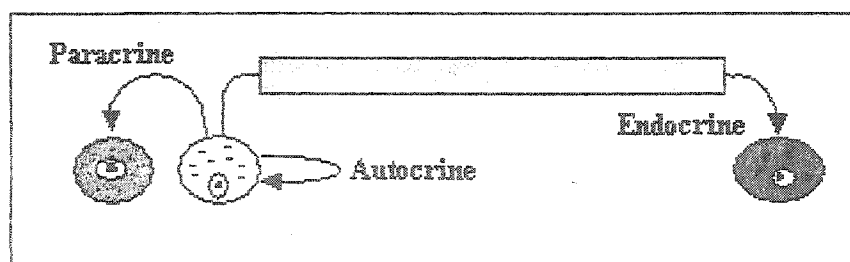


2- Physiologie du pancréas endocrine

2-1 Principes d'endocrinologie

L'endocrinologie est l'étude des hormones, de leurs récepteurs et des voies de signalisation intracellulaire qu'elles empruntent. Une hormone est une molécule ou messenger chimique qui est sécrétée dans le sang ou dans les fluides extracellulaires et qui va affecter le fonctionnement d'une ou de plusieurs cellule(s) cible(s). Une cellule cible ne peut répondre à l'hormone que si elle exprime un récepteur fonctionnel pour cette hormone. Dépendamment de la distance qui sépare la cellule sécrétrice de la cellule cible, l'effet hormonal est soit autocrine, soit paracrine soit endocrine. L'action d'une hormone qui agit sur la cellule qui la produit et la sécrète est dite autocrine. Une hormone qui agit localement dans le fluide extracellulaire sur une cellule voisine médie un effet dit paracrine. Une hormone qui agit par l'intermédiaire du sang à distance de la cellule sécrétrice agit de façon endocrine (Figure ci-dessous).

L'îlot de Langerhans est une structure endocrine parce qu'il sécrète des hormones qui agissent sur des récepteurs spécifiques et médient à la fois des actions autocrines, paracrines et endocrines. Le paragraphe suivant va décrire l'îlot de Langerhans afin de bien comprendre comment de par sa structure il va médier ces trois types d'actions.



2-2 L'îlot de Langerhans

C'est en 1869 qu'un jeune étudiant allemand en médecine du nom de Paul Langerhans a observé une structure arrondie et répétitive sur des coupes de pancréas humain qu'il a appelé « îlot ». Étant le premier à avoir décrit cette structure vitale pour l'organisme (Langerhans, 1937), l'appellation de l'îlot pancréatique est depuis toujours accompagnée du nom de Langerhans (Fig.5A).

Les îlots pancréatiques matures chez l'adulte sont composés d'une population hétérogène d'au moins quatre types cellulaires chacun responsable de la synthèse et de la sécrétion d'une hormone (Fig. 5B). Les cellules bêta (β ou B) représentent 65-90 % du volume de l'îlot et produisent l'insuline. Elles occupent le centre de l'îlot. Les cellules alpha (α ou A2) qui produisent le glucagon occupent une position souvent périphérique. Les cellules delta (δ ou A1) qui synthétisent la somatostatine sont souvent présentes en périphérie de l'îlot mais parfois aussi regroupées au centre de l'îlot. Elles représentent 3 à 10 % du volume de l'îlot. Enfin les cellules PP (ou F) qui produisent le polypeptide pancréatique occupent à peine 1 % de l'îlot. L'îlot de Langerhans est également innervé par des fibres nerveuses qui produisent le peptide vasoactif intestinal (VIP), la cholécystokinine (CCK), l'enképhaline et la substance P (Larsson LI, 1979).

Les îlots de Langerhans sont disséminés dans le parenchyme exocrine donc séparés les uns des autres anatomiquement. Pourtant ils forment la composante endocrine du pancréas vitale pour l'organisme. Afin de bien comprendre comment les hormones pancréatiques peuvent médier leurs effets paracrines et endocrines, il est

Figure 5. L'îlot de Langerhans. A. Paul Langerhans (1847-1888). En 1869, il fut le premier à caractériser les îlots dans le pancréas comme étant des structures arrondies et répétitives B. Immunofluorescence indirecte sur coupes sériées de pancréas humain adulte sain. L'îlot de Langerhans comporte au moins 4 types cellulaires différents synthétisant et sécrétant chacun une hormone. L'insuline par les cellules bêta (verte), le glucagon par les cellules alpha (bleu) et la somatostatine par les cellules delta (rouge). Résultats personnels non publiés.

A.



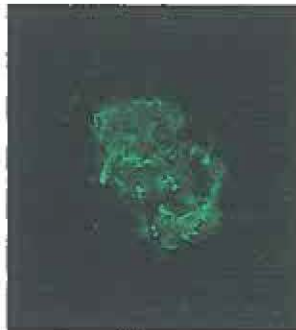
Paul Langerhans

B.

Cellules α à
Glucagon



Cellules β à
insuline



Cellules δ à
somatostatine



Îlot de Langerhans

essentiel de présenter l'îlot comme un microorgane doté d'un véritable réseau artériel et veineux lui permettant de jouer son rôle au niveau de toutes les cellules de l'organisme. Liu et al., 1993, ont très bien démontré et illustré l'architecture du réseau artériel et veineux de l'îlot de Langerhans (Fig. 6A-B). Chaque îlot est doté d'une à trois artéριοles afférentes qui irriguent le centre de l'îlot et le manteau périphérique pour l'apport des nutriments et des facteurs hormonaux, et de deux veines efférentes qui véhiculent la sécrétion endocrine vers toutes les cellules de l'organisme via la circulation générale (Jansson and Carlsson, 2002).

Le nombre de cellules qui compose l'îlot de Langerhans varie de 200 cellules pour le plus petit îlot jusqu'à 2000 cellules pour le plus gros leur conférant des tailles de 40 μm et 600 μm respectivement. Par contre, le nombre d'îlots dans un pancréas varie considérablement d'une espèce à l'autre. En effet, le pancréas de rat contient environ 1500 îlots, celui de la souris environ 800 et celui de l'humain en décompte près de 2 millions. Finalement, chez la truite le pancréas contient deux îlots appelés corps de Brockman (Ehrman et al., 2004).

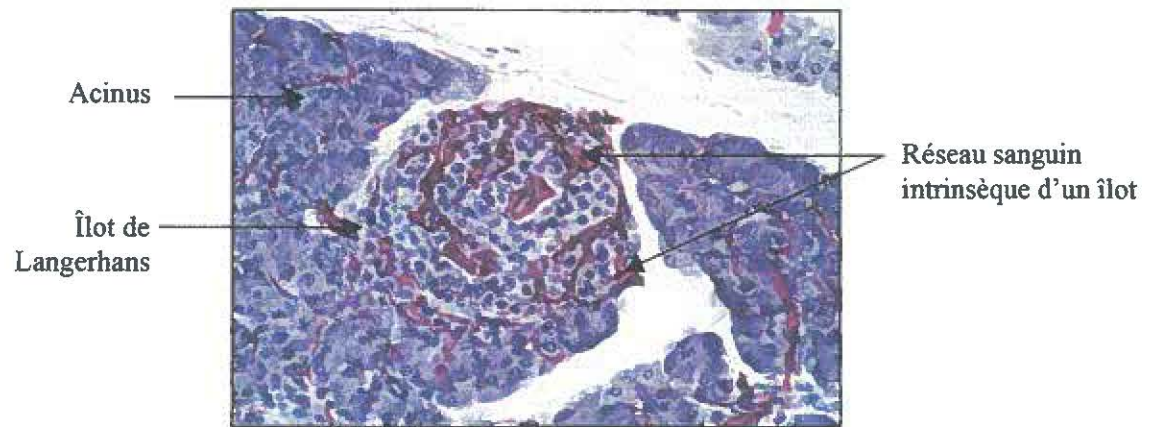
2-3 L'insuline

2-3-1 Découverte

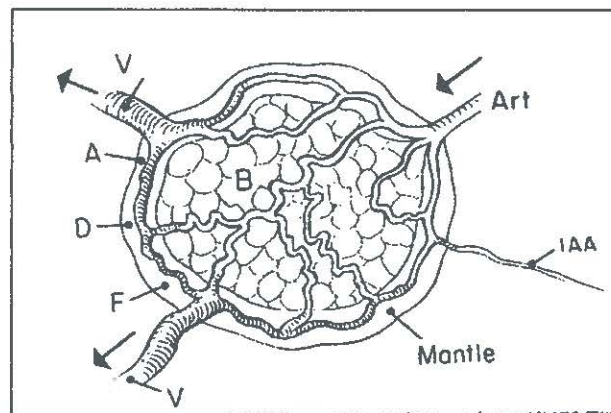
La cellule bêta de l'îlot de Langerhans de mammifère représente un aspect vital pour l'organisme puisqu'elle est la seule à produire l'insuline qui est à ce jour

Figure 6 : Vascularisation intrinsèque de l'îlot de Langerhans. A. Chaque îlot est drainé par au moins 3 artérioles qui se ramifient autour d'un réseau de capillaires fenêtrés dans lequel les hormones pancréatiques sont sécrétées. Les hormones sont exportées de l'îlot via un réseau veineux vers la veine porte pour ensuite rejoindre la circulation générale. Tiré de B. Young et JW Heath dans Weather's functional histology, 2000. Edition Churchill Livingstone. B. Schématisation de l'architecture sanguine de l'îlot de Langerhans décrite en A. (Art) : artériole afférente; (V) : Veinules; (IAA) : Anastomose îlot-acinaire. Les cellules A, D et F situées dans le manteau (mantle) sécrètent le glucagon, la SS et le PP respectivement. Les cellules B à insuline sont localisées au centre de l'îlot. Tiré de Liu Y et al., 1993.

A



B



l'unique hormone hypoglycémiante de l'organisme. Les paragraphes suivants vont donc décrire l'hormone insuline, ses rôles dans l'organisme et ses modes d'action.

La découverte de l'insuline reste à ce jour l'une des plus importantes du XXème siècle. En 1921, Frederick Grant Banting, jeune chirurgien de 26 ans persuade James John Richard MacLeod, chercheur à l'Université de Toronto au Canada, de lui fournir des locaux et des chiens afin de lui permettre de purifier la sécrétion des îlots de Langerhans avec l'aide d'un ami chimiste, James Bartram Collip. MacLeod fait mieux, il leur propose aussi un assistant de recherche en physiologie, Charles Herbert Best. En mai 1921, les premiers essais sont concluants et l'extrait isolé est suffisamment pur pour l'injecter à une chienne rendue diabétique qui survivra à la maladie. Les extraits encore plus purifiés sont injectés chez un patient gravement malade, Leonard Thomson, qui survivra lui aussi. Les résultats sont rapidement publiés (Banting et al., 1922; Banting and Best, 1922). En 1923, Banting et MacLeod reçoivent le Prix Nobel de médecine et le partagent respectivement avec Collip et Best (Fig. 7A).

2-3-2 L'hormone

L'insuline est une hormone peptidique hydrosoluble, chef de file de la famille des facteurs de croissance homologues à l'insuline, les IGF (Insulin-like Growth Factor) ou somatomédines. L'ARN messager de l'insuline est traduit en préproinsuline. Le clivage du peptide signal lors de la translocation dans le réticulum endoplasmique donne la proinsuline qui comprend trois domaines : Une chaîne B aminoterminal et une chaîne A carboxyterminale liées entre elles par le peptide C

Figure 7 : L'insuline. A. Banting et Best ont reçu le Prix Nobel de médecine en 1923 pour avoir découvert et purifié l'hormone insuline. Ils ont partagé leur récompense avec MacLeod et Collip respectivement. B. Dans le réticulum endoplasmique, la proinsuline est clivée par des endopeptidases spécifiques qui libèrent en quantité équimolaire le peptide C et l'insuline emmagasinés ensuite dans des granules sécrétoires C. Structure de l'insuline bicaténaire. Une chaîne A de 21 acides aminés liée par deux ponts disulfure avec une chaîne B de 30 acides aminés. L'homologie de séquence est très conservée entre les espèces respectant ainsi une structure assez semblable dans le règne animal.

A



Banting FG



Best CH

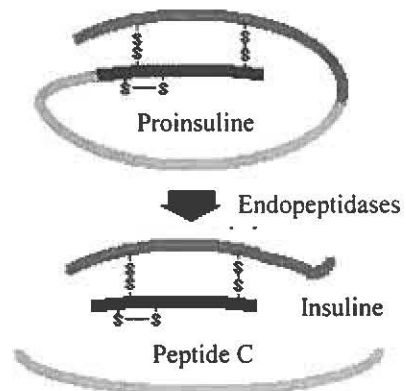


Collip JB

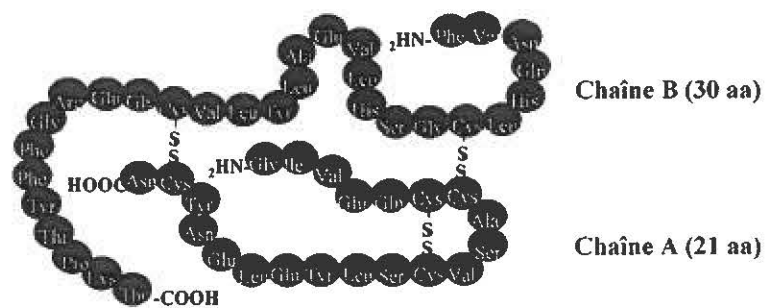


MacLeod JR

B



C

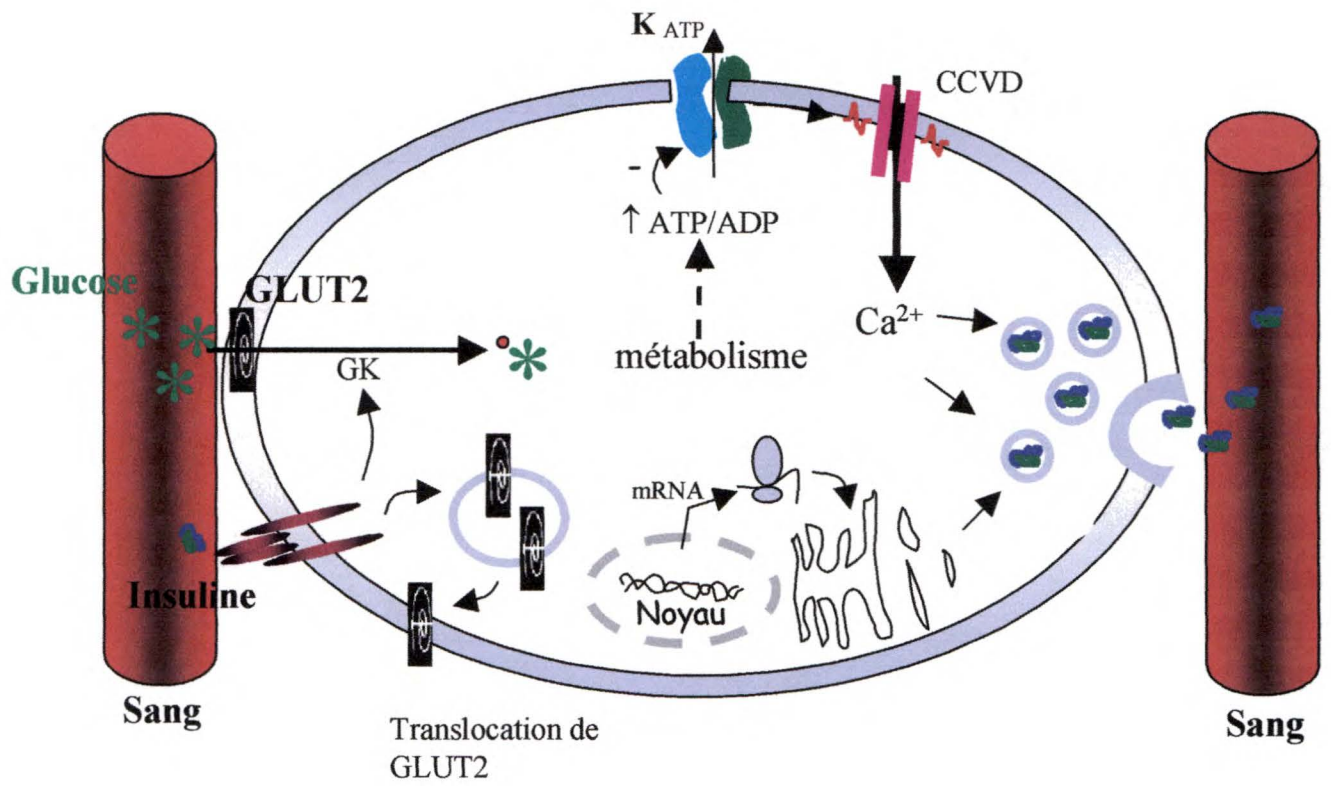


(pour Connecting) (Fig. 7B). Dans le réticulum endoplasmique, la proinsuline est clivée par des endopeptidases spécifiques, les furines. L'insuline et le peptide C ainsi formés sont emmagasinés dans des granules sécrétoires issus de l'appareil de Golgi sous forme d'hexamères en présence d'ions zinc et dans un milieu acide. L'insuline mature est donc un peptide de 51 acides aminés ayant un poids moléculaire de 5808 Da, la chaîne A de 21 acides aminés possède un pont disulfure intra caténaire (A6-A11), la chaîne B de 30 acides aminés est reliée à la chaîne A par deux ponts disulfure (A7-B7 et A20-B19) (Fig. 7C).

2-3-3 Mécanismes de sécrétion de l'insuline

L'insuline est sécrétée suite à une augmentation du taux de glucose dans le sang. La cellule bêta possède des protéines sensibles au glucose, les transporteurs GLUT-2 qui permettent la diffusion facilitée du glucose à l'intérieur de la cellule. Le métabolisme du glucose dans le cycle des citrates entraîne une augmentation du rapport ATP/ADP fermant de ce fait les canaux K-ATP dépendant présents sur la membrane plasmique. Ceci engendre une dépolarisation membranaire activant à son tour les canaux calciques voltage-dépendants responsables d'un influx de calcium dans le cytoplasme. Cette augmentation calcique intra cytoplasmique provoque l'exocytose des granules sécrétoires (Soria et al., 2000; Kulkarni, 2002) (Fig. 8). L'insuline et le peptide C sont alors libérés en quantité équimoléculaire dans les capillaires de l'îlot puis sont véhiculés par la veine pancréatico-duodénale directement dans le foie. A ce niveau, 50% de l'insuline est dégradé et le reste est

Figure 8 : Mécanisme de sécrétion de l'insuline. L'hyperglycémie stimule la translocation du glucose dans la cellule par un transporteur du glucose (GLUT 2). Le métabolisme du glucose qui commence par l'action de la glucokinase (GK) augmente le rapport ATP/ADP de la cellule bloquant ainsi la sous-unité ATP dépendante du canal potassium (K_{ATP}) menant à une dépolarisation membranaire. Il y a alors activation d'un canal calcique voltage dépendant (CCVD) par lequel les ions calcium vont entrer dans la cellule menant à l'exocytose des granules matures contenant l'insuline. Le gène de l'insuline est transcrit en une préproinsuline qui perd son peptide signal dans le réticulum endoplasmique puis la proinsuline ainsi formée subit une maturation dans le corps de Golgi et est stockée dans des granules de sécrétion. L'insuline en se fixant à son récepteur stimule ce phénomène en activant l'enzyme GK et en favorisant la translocation des GLUT-2 à la membrane.



distribué dans la circulation générale pour agir sur l'ensemble des cellules cibles de l'organisme. L'insuline mature est emmagasinée sous forme d'hexamères dans les granules de sécrétion en raison du pH acide de ces derniers, mais elle est libérée sous forme monomérique dans le sang. Elle diffuse alors rapidement dans les cellules et sa demi-vie plasmatique est de 4 minutes. Il existe une sécrétion basale d'insuline, mesurée la nuit, estimée à 1.3 ± 0.4 mUI/h. Sur 24 heures, la sécrétion totale d'insuline chez un sujet ayant une alimentation équilibrée en glucides est de 60 ± 15 UI. (Reaven et al., 1993; Chevenne et al., 1999).

2-3-4 Les récepteurs de l'insuline et leurs voies de signalisation

Même si la séquence primaire de l'insuline varie de un à plusieurs acides aminés d'une espèce à l'autre, l'homologie de séquence reste hautement conservée dans le règne animal aussi bien chez les vertébrés que chez les invertébrés (Murray-Rust et al., 1992) surtout au niveau de certains segments de la molécule essentiels à sa structure tertiaire dont ceux incluant les ponts disulfures. Ainsi, la structure tridimensionnelle de l'insuline est très similaire d'une espèce à l'autre. L'insuline d'un animal est alors biologiquement active chez les autres espèces.

L'insuline joue un rôle majeur dans le métabolisme glucidique et lipidique puisqu'elle contrôle la mise en réserve et l'utilisation des sucres et des acides gras, jouant ainsi son rôle vital d'hormone hypoglycémiante. Elle joue également un rôle sur le métabolisme protéique, la croissance, le développement et la mort cellulaire. Ces effets physiologiques ne peuvent avoir lieu que si l'insuline sécrétée par la cellule

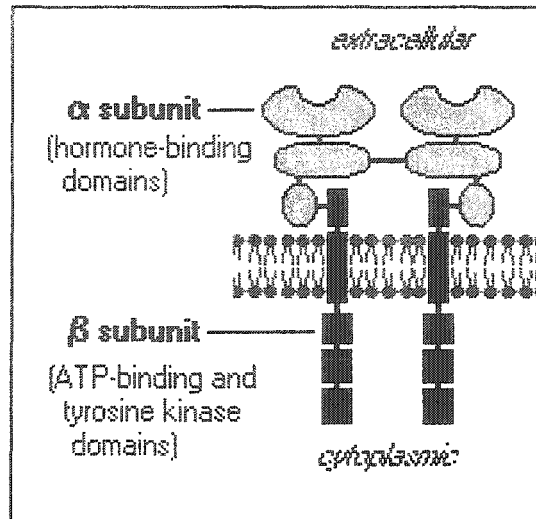
bêta et véhiculée par le sang va se lier de façon spécifique à un récepteur membranaire présent sur une cellule cible appropriée.

a) Les récepteurs de l'insuline

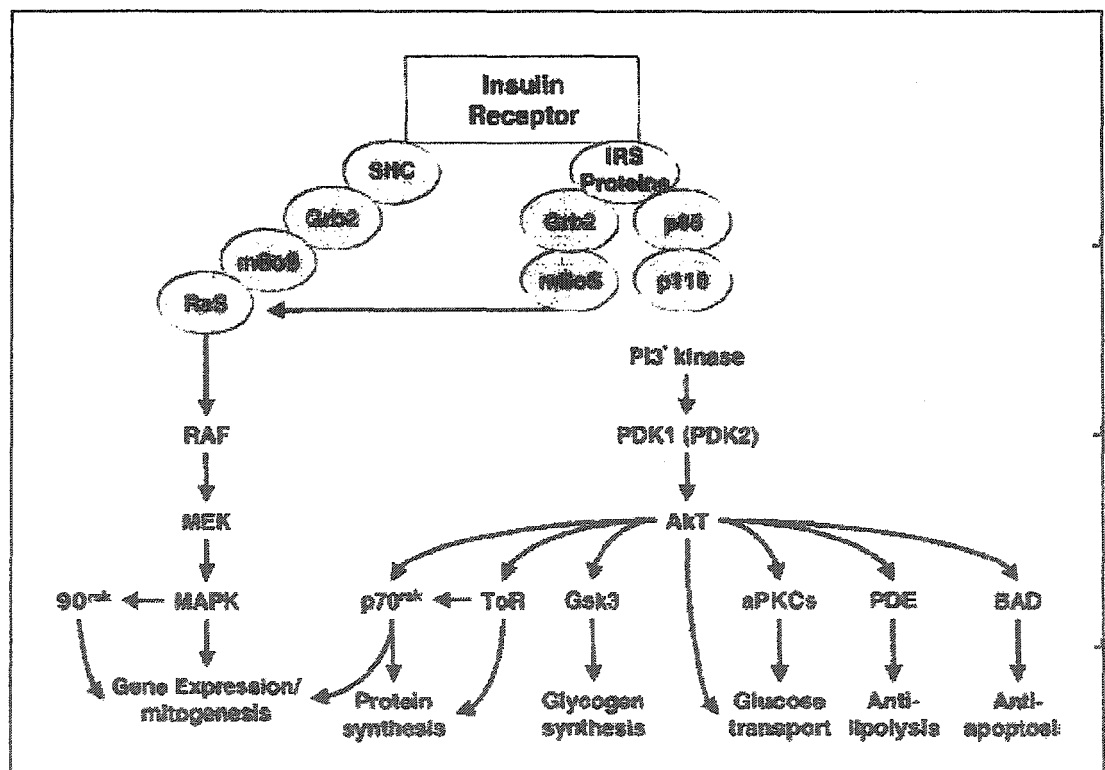
Les récepteurs de l'insuline appartiennent à la sous-famille des récepteurs tyrosine kinase incluant les récepteurs de l'IGF-1 et de l'IGF-2 ainsi que le récepteur IRR (insulin receptor-related receptor). Les caractéristiques structurales et fonctionnelles ont été exhaustivement détaillées par Perz and Torlinska, 2001. Brièvement, les récepteurs de l'insuline sont des glycoprotéines membranaires hétérodimériques composées de deux monomères ($\alpha\beta$) agissant comme des enzymes allostériques (1 sous-unités α régulatrice et une sous-unités β catalytique liées entre elles par des ponts disulfures) (Fig 9A). A l'état de repos, les sous-unités α maintiennent le récepteur dans une configuration qui le rend inactif. Ainsi, les sous-unités β à l'état inactif maintiennent un domaine régulateur à activité tyrosine kinase replié sur lui-même qui bloque la liaison de l'ATP. Une seule molécule d'insuline est nécessaire pour l'activation du récepteur. La liaison de l'insuline sur une des sous-unités α extracellulaires permet le rapprochement des deux monomères ($\alpha\beta$). Ce changement conformationnel permet le déploiement de la boucle d'activation qui expose son site de liaison pour l'ATP et le domaine intra cytoplasmique à activité tyrosine kinase de la sous-unité β ainsi que la transphosphorylation de 3 résidus tyrosines (Tyr¹¹⁶², Tyr¹¹⁵⁸ et Tyr¹¹⁶³) de chacune des deux sous-unités β . Le récepteur ainsi autophosphorylé va à son tour phosphoryler des protéines substrats intracellulaires responsables de la transduction du signal insulinique (Kido et al.,

Figure 9 : Modes d'action de l'insuline. A. Le récepteur tyrosine kinase de l'insuline est un hétérodimère composé de 2 sous-unités β et de deux sous unités α . Les sous unités α sont extracellulaires et comportent le domaine de liaison à l'insuline. Les sous-unité β intracellulaires contiennent des domaines à activité tyrosine kinase qui permettent l'activation du récepteur par transphosphorylation. B. Les deux voies principales par lesquelles l'insuline transduit ses effets biologiques sont la voie PI3Kinase qui médie essentiellement les effets métaboliques de l'insuline alors que la voie MAPKinase médie les effets impliqués dans l'expression génique et la croissance. Tiré de Le Roith and Zick, 2001.

A



B



2001). Parmi ces protéines substrats, les IRS (Insulin receptor substrate) jouent un rôle clé dans la transduction du signal de l'insuline parce qu'elles possèdent un motif consensus de type Y-X-X-M phosphorylable par le récepteur tyrosine kinase. Ces motifs activés sur des résidus tyrosines augmentent l'affinité de chacun des IRS pour d'autres molécules signalétiques spécifiques (Kido et al., 2001; Saltiel and Kahn, 2001). Il peut alors se former une variété de complexes protéiques à l'origine de la diversité du signal insulinique. Ceci explique la raison pour laquelle l'insuline est appelée hormone pléiotropique.

Les deux voies principales de signalisation qu'emprunte l'insuline suite à l'activation des récepteurs tyrosine kinase et des IRS sont la voie de la phosphatidylinositol 3 (PI-3) kinase impliquée principalement dans le contrôle des effets métaboliques et la voie des Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) impliquée dans la croissance, la différenciation et l'expression de gènes (Fig 9B). La troisième voie plus méconnue implique le couplage du récepteur tyrosine kinase de l'insuline avec une protéine G menant elle aussi à des effets physiologiques.

b) La voie de la PI-3 kinase

L'insuline (premier messenger) lie donc son récepteur qui s'autophosphoryle et phosphoryle à son tour des IRS. Les domaines phosphorylés sur tyrosine des IRS servent alors de sites d'arrimage pour les domaines Src homology 2 (SH2) portés par d'autres protéines (Saltiel and Kahn, 2001). Parmi elles, la phosphatidylinositol 3 (PI3) kinase ou PI-3K composée d'une sous-unité catalytique p110 et d'une sous-unité régulatrice/adaptatrice p85 qui porte deux domaines SH2. Il existe des iso

formes de la sous-unité p85 mais leur rôle dans la transduction du signal de l'insuline n'a pas été déterminé. La PI-3K est une enzyme à deux fonctions. D'une part, c'est une lipide kinase qui va phosphoryler des phospholipides membranaires et produire ainsi des seconds messagers lipidiques comme le phosphatidylinositol (3,4) bi phosphates (PI_{3,4}-P₂) et des phosphatidylinositol (3,4,5) triphosphates (ou PI-P₃) (Franke et al., 1997) qui créent des sites de reconnaissance pour les domaines PH (pleckstrin homology) situés sur d'autres kinases dont les protéines kinases PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1) et Akt qui transloquent alors du cytoplasme à la membrane plasmique (Corvera and Czech, 1998). D'autre part, la PI-3K est une sérine/thréonine kinase, elle peut donc directement phosphoryler et activer Akt (aussi connu sous le nom de protéine kinase B). PDK1 activée peut également phosphoryler et activer Akt lorsqu'elle est à la membrane. Dans tous les cas, Akt/PKB activée va à son tour phosphoryler d'autres messagers moléculaires cytoplasmiques impliqués dans les nombreux effets métaboliques de l'hormone (Saltiel and Pessin, 2002; Kirwan and del Aguila, 2003).

** Transport du glucose*

L'insuline facilite l'entrée du glucose dans les muscles et les adipocytes qui l'utilisent comme substrat primaire pour la synthèse du glycogène musculaire et du glycérol respectivement. Le seul mécanisme par lequel les cellules peuvent absorber du glucose implique la capacité de l'insuline à augmenter rapidement le transport cellulaire du glucose depuis le compartiment sanguin jusqu'au cytoplasme cellulaire. Ceci résulte de la translocation des transporteurs d'hexoses appelés GLUT depuis un

compartiment intracellulaire jusqu'à la membrane plasmique. Il existe actuellement 10 isoformes de GLUT répartis en deux classes, selon leur dépendance d'un apport énergétique pour fonctionner. Les adipocytes et les muscles expriment plusieurs isoformes de transporteurs, principalement GLUT-1 et GLUT-4 qui permettent une diffusion facilitée et passive du glucose dans la cellule. Au repos, les transporteurs sont retenus dans la cellule au sein de vésicules intracellulaires spécifiques appelées GLUT-(1)4 Storage Vesicles (GSV). Lorsque le taux d'insuline plasmatique augmente, les récepteurs de l'insuline sont activés et par un mécanisme impliquant une voie dépendante de la PI3 Kinase, la mobilisation du réseau des micro filaments d'actine et le complexe de reconnaissance vésicules/membranes cible de type v-SNARE/t-SNARE (vesicle and target Soluble NSF attachment protein receptor), les vésicules fusionnent à la membrane plasmique et exposent les transporteurs qui capturent le glucose et le font pénétrer dans la cellule (Holman and Kasuga, 1997; Ducluzeau et al, 2002). Ils sont ensuite internalisés lorsque la concentration d'insuline plasmatique diminue. Deux exceptions cependant, le foie et le cerveau ne requièrent pas un mécanisme insulino-dépendant pour capter le glucose. L'insuline contribue à la translocation du transporteur du glucose GLUT-4 via l'activation de l'isoforme atypique zêta de la protéine kinase C (PKC ζ). Ces mécanismes proposés à partir d'études effectuées sur des adipocytes de rats (Standaert et al., 1997) sont également retrouvés dans les cellules musculaires humaines (Kim et al, 1999).

* Métabolisme glucidique

L'insuline agit sur les voies métaboliques des glucides, lipides et protéines donc sur la mise en réserve de l'énergie. Ses principaux organes cibles sont le muscle, le tissu adipeux et le foie. L'insuline stimule l'accumulation de glycogène dans les muscles et le foie par une action coordonnée qui augmente à la fois l'absorption de glucose (dans le foie cette absorption est non insulino-dépendante) et la synthèse du glycogène en stimulant la translocation du transporteur au glucose et en stimulant la synthèse *de novo* de l'enzyme glycogène synthase respectivement. Elle stimule aussi l'induction de l'hexokinase et de la pyruvate kinase qui sont les enzymes limitantes de la glycolyse. Par contre, elle inhibe les enzymes limitantes de la synthèse *de novo* du glucose, la gluconéogenèse, dont la glucose-6-phosphatase et la phosphoénolpyruvate carboxykinase. Il a été démontré que la PKB (Akt) activée phosphoryle et inactive la glycogène synthase 3 kinase (GSK3), diminuant de ce fait le taux de phosphorylation de la glycogène synthase (Cross Da et al. 1995). Dans ce cas particulier, c'est l'état de déphosphorylation qui augmente l'activité de l'enzyme essentielle à la glycogénogenèse. Dans une étude effectuée sur une lignée d'adipocyte, la stimulation de la synthèse de glycogène implique la PI3 Kinase (Shepherd et al., 1995).

Le contrôle négatif de l'expression génique par l'insuline implique la voie PI3 Kinase. Il a été démontré que les facteurs de transcription de la famille forkhead (FKRH) jouaient un rôle essentiel dans l'homéostasie glucidique des hépatocytes. En effet, phosphorylé par PKB/Akt, FKHR est retenu dans le compartiment

cytoplasmique et/ou dégradé par le protéasome (Matsuzaki et al., 2003) induisant de ce fait la répression de ses gènes cibles dont les plus importants sont la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) (Yeagley et al., 2001) et la glucose-6 phosphatase (Lin et al., 1997).

L'insuline augmente aussi la synthèse protéique en bloquant la dégradation des protéines par l'activation de la protéine kinase mTOR (mammalian target of rapamycin) membre de la famille de la PI-3K, via PKB/Akt. mTOR agit en tant que sérine kinase plutôt que lipide kinase et agit directement sur la machinerie traductionnelle en activant p70^{rsk} (p70 ribosomal S6 kinase) et eIF-4^E (initiation factor 4E for eucaryotic translation) (Lawrence and Abraham, 1997).

** Métabolisme lipidique*

Les effets de l'insuline sur le métabolisme des lipides sont nombreux. Les plus importants impliquent la lipogénèse (biosynthèse des acides gras) dans le foie et les adipocytes. Les triglycérides alimentaires sont dégradés dans la lumière du tube intestinal, ce qui leur permet de franchir la muqueuse intestinale. Ils sont ensuite re-synthétisés dans la paroi du grêle en triglycérides, puis par voie lymphatique rejoignent la circulation générale. Les adipocytes synthétisent alors des triglycérides à partir des acides gras captés dans le sang et du glycérol issu de la captation du glucose. L'insuline favorise ces transformations d'une part en stimulant l'enzyme limitante de l'entrée des graisses dans les tissus périphériques, la lipoprotéine lipase des capillaires et en inhibant l'enzyme triglycéride lipase responsable de la lipolyse. La lipogénèse hépatique se produit lorsque le foie est saturé en glycogène (5% de sa

masse). Tout glucose supplémentaire emprunte alors la voie de synthèse des acides gras stimulée par l'insuline. Les acides gras ainsi formés sont exportés sous forme de lipoprotéines dans la circulation générale et utilisés pour la lipogénèse des adipocytes.

c) La voie MAPKinase

La voie MAPKinase est activée par la liaison de la protéine-2 de liaison du récepteur au facteur de croissance Grb2 (Growth factor receptor binding protein 2) aux tyrosines phosphorylées de l'IRS via leur domaine SH2. Grb2 est prélié à mSOS (mammalian Son of Sevenless) qui échange du GDP pour du GTP sur la protéine Ras. Ras lié à la membrane plasmique devient ainsi activé et se lie au domaine N-terminal de la protéine Raf permettant son recrutement à la membrane. L'interaction Ras/raf permet la phosphorylation de Raf par des sérine/thréonine kinases. La transmission du signal est ensuite transmise par phosphorylation séquentielle de kinases. Raf active MEK-1 par la phosphorylation sur deux résidus sérines. A son tour MEK-1 phosphoryle deux isoformes MAPK, ERK1 et ERK2 (Extracellular signal-regulated kinase 1 and 2) sur des résidus sérines et thréonines. ERK1/2 activés vont médier le signal insulinique en phosphorylant des facteurs de transcription impliqués dans la croissance cellulaire et/ou l'induction de gènes. En effet, ERK1/2 activés transloquent au noyau où ils vont phosphoryler des facteurs de transcription à l'origine d'un processus transcriptionnel menant à la prolifération cellulaire et la différenciation (Boulton et al, 1991).

d) Voie mettant en jeu les protéines G

Une autre voie empruntée par l'insuline implique la mobilisation de protéines G (GTP-Binding proteins) connues maintenant pour être capables de médier le message insulinique via l'activation du récepteur tyrosine kinase. Ceci met donc en évidence le rôle de l'enzyme adénylate cyclase (AC) et du second messenger intracellulaire l'AMPc dans la transduction du message insulinique. Quelques études réalisées au cours des années 1970 ont démontré un effet inhibiteur et activateur de l'insuline sur l'activité de l'AC et sur les taux intracellulaires d'AMPc. Pertseva et al. ont exhaustivement détaillé l'historique de ces études depuis l'année 1967 jusqu'à nos jours (Pertseva et al., 2003).

D'un point de vue moléculaire, la présence d'un motif consensus de type BBXXB présent sur la troisième boucle intracellulaire des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG) joue un rôle majeur dans l'interaction du récepteur avec les protéines Gs et Gi/o. Ce motif est également présent dans la partie C-terminale de la sous-unité β intra cytoplasmique du récepteur à tyrosine kinase (Okamoto et al., 1991; Pertseva et al., 2003). Plusieurs études ont démontré une interaction directe entre le récepteur tyrosine kinase et la protéine Gs (Pertseva et al., 1995), ou la protéine Gi/o (O'Brien et al., 1987; Luft, 1997; Sanchez-Margalet et al., 1999; Kreuzer et al. 2004) ou les deux (Sun et al., 1993).

A ce jour, les fonctions biologiques associées à ce type de transduction sont rares mais présentent un intérêt.

** Effet mitogénique*

Des études effectuées sur la lignée NIH 3T3 et aussi à partir de cultures primaires de myoblastes de poulet ont démontré l'implication du couplage du RTK avec la protéine Gs (Pertseva et al., 2003). Il a été suggéré que cet effet sur la croissance de ces cellules pouvait interagir avec la voie classique des MAPK (Gutkind, 1998).

** Effet anti-apoptotique*

L'effet anti-apoptotique de l'insuline peut être médié par la voie dépendante de l'AMPC dans des cellules de la moelle osseuse (Berridge et al., 1993). D'autres études ont aussi démontré l'implication de la PKA dans l'effet anti-apoptotique de l'IGF-1 sur des cellules HEK 293 (Lizcano et al., 2000). Les mécanismes de régulation de cette voie potentielle restent à être définis.

** Effet anti-lipolytique*

L'activation d'une protéine Gi résulte en une diminution des niveaux d'AMPC intracellulaires. Des études ont montré que lors du phénomène de résistance à l'insuline, la capacité de l'hormone à promouvoir une action anti-lipolytique AMPC dépendante était perdue. Il a été suggéré que ceci était dû à la perte de transduction du signal insulinique par l'incapacité du RTK à stimuler une protéine Gi (Londos et al., 1985).

Finalement, une étude récente vient de démontrer que l'insuline était impliquée dans le processus de l'agrégation plaquettaire en diminuant les niveaux d'AMPc intracellulaires via l'activation d'une protéine G_i interagissant directement avec l'IRS-1 (Ferreira et al., 2004).

Il est évident que de nombreuses questions persistent quant à la régulation de ces voies. Cependant ce modèle nous permet d'envisager les effets de l'insuline sur l'expression du gène de la somatostatine.

2-3-5 Rôle de l'insuline sur la sécrétion de la somatostatine pancréatique

L'effet de l'insuline sur la sécrétion de somatostatine pancréatique demeure controversé car trop peu d'études ont été effectuées à ce jour pour tenter d'éclaircir cette contradiction. En effet, l'insuline induit la sécrétion de SS-25 des corps de Brockmann chez la truite arc-en ciel, et cet effet est modulé par la concentration de glucose (Eilertson et al., 1995). D'autres études effectuées chez les mammifères ont montré que l'insuline stimulait la sécrétion de SS à partir d'un pancréas perfusé chez le poulet (Honey and Weir, 1979).

D'autres études au contraire, ont démontré un effet inhibiteur de l'insuline sur la sécrétion de la SS pancréatique chez le chien normal et diabétique et que cet effet était indépendant du glucose (Ribes et al., 1988). L'administration d'insuline exogène inhibe la sécrétion de SS induite par le glucose sur des pancréas purifiés isolés de rats (Gerber et al., 1981). La même année, Rouiller et al. ont démontré que les sécrétions de SS pancréatique et gastrique induites par une injection intragastrique d'acide

chlorhydrique sur des chiens normaux ayant subi une laparotomie étaient inhibées suite à une injection intraveineuse d'insuline. Aussi, sur une période de 48h, l'insuline ajoutée dans le milieu de culture d'îlots purifiés de rats inhibe la sécrétion de somatostatine (Schaffer et al., 1985).

L'insuline peut aussi n'avoir aucun effet sur la sécrétion de somatostatine d'îlots pancréatiques de rats en culture puisque l'immunosuppression de l'insuline ne montre aucun changement de sécrétion quelle que soit la concentration de glucose présente dans le milieu (Murakami et al., 1982), ni sur la sécrétion de SS de pancréas perfusé chez le chien (Patton et al., 1977) ni à partir d'une culture primaire de cellules de pancréas de rats nouveau-nés (Patel et al., 1979). Ainsi, l'effet paracrine de l'insuline sur la sécrétion de somatostatine pancréatique reste à ce jour encore très controversé et les mécanismes impliqués inconnus.

2-4 La somatostatine

La somatostatine ou SRIF (Somatotrope Release Inhibitory Factor) ou SS-14 est un tétradecapeptide cyclique isolé pour la première fois à partir d'extraits hypothalamiques et caractérisé comme un puissant inhibiteur de la libération de l'hormone de croissance GH (Growth Hormone) par des cellules hypophysaires en culture (Brazeau et al., 1973). La famille de la SS s'est agrandie lorsqu'un peptide de 28 acides aminés isolé à partir d'extraits d'intestin et de cerveau possédait dans sa

partie carboxy-terminale la structure exacte de la SS-14 (Pradayrol et al. 1980; Esch et al., 1980).

Plus récemment, un troisième peptide contenant dans sa séquence primaire 11 acides aminés des 14 présents dans celle de la SS-14 a été découvert dans le cerveau de rat et d'humain et appelé Cortistatine (de Lecea et al., 1996). Jusqu'à ce jour, son expression demeure restreinte au SNC (de Lecea et al., 1997).

2-4-1 Distribution

Les cellules qui produisent la somatostatine ont une distribution assez générale dans l'organisme. Il y a les neurones et les fibres nerveuses qui possèdent de longs prolongements cellulaires (Finley et al., 1981) et les cellules sécrétoires (D, δ ou A1) qui possèdent également des prolongements cellulaires indispensables à leur fonction (Larsson et al., 1979). Les cellules productrices de SS sont retrouvées en grande quantité dans le SNC et SNP, excepté le cervelet (Johansson et al., 1984; Finley et al., 1981), dans la thyroïde (Reichlin, 1983), les reins, la prostate, le placenta, le thymus (Fuller et al., 1989), le système lymphatique (Aguila et al., 1991), l'intestin et le pancréas endocrine. Dans le tractus gastro-intestinal, les deux types cellulaires neuronal et sécrétoire sont présents. Les cellules sécrétoires sont visibles dans la muqueuse intestinale de rat et d'humain (Francis et al., 1990) alors que les neurones et fibres nerveuses sont présents dans la sous-muqueuse et le plexus myentérique de rat (Vinik et al., 1981). Dans le pancréas, la SS a été mise en évidence par immunofluorescence dans les cellules D chez plusieurs espèces (Dubois, 1975; King et al., 1979; Trent and Weir, 1981).

Dans l'estomac, le pancréas, les couches musculaires de l'intestin, l'expression de la SS-14 prédomine autant chez le rat (Trent and Weir, 1981; Vinik et al., 1981; Patel et al., 1981) que chez l'humain (Penman et al., 1983; Keast et al., 1984). La SS-28 est présente dans les cellules de la muqueuse intestinale qui constituent la plus grande source périphérique du peptide (Francis et al., 1990). Par contre, la SS-28 ne représente que 20 % de la SS du cerveau. Chez le rat, l'immunoréactivité de la SS totale a été estimée et suite à cette étude, l'intestin contiendrait 65 % de SS, le cerveau 25 %, le pancréas 5 % et les 5 % restants seraient attribués aux autres organes produisant le peptide (Patel and Reichlin, 1978).

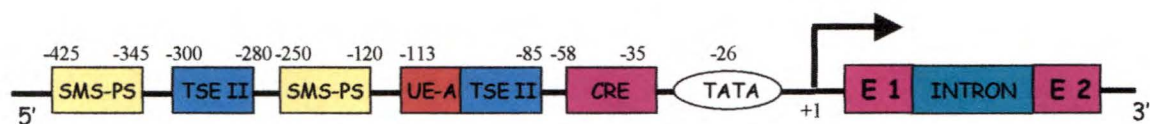
2-4-2 Gène et produits du gène de la somatostatine

La SS-14 et SS-28 sont toutes les deux codées par un même gène chez l'humain (Shen and Rutter, 1984) présent sur le bras long du chromosome 3 et chez le rat (Montminy et al., 1984). Chez les téléostéens dont les plus étudiés sont la truite Arc-en-ciel et le saumon, SS-14 et SS-25 sont codées par deux gènes différents, l'un générant la préprosomatostatine I (PPSI) identique à celle des mammifères et à l'origine de la SS-14, et l'autre générant la préprosomatostatine II (PPSII) à l'origine d'une SS-25, homologue pour 50 % à la SS-28 des mammifères (Su et al., 1988; Conlon et al., 1997; Moore et al., 1999) (Fig 10).

Chez les mammifères, la SS-14 étant une structure intrinsèque de la SS-28, l'hypothèse que la SS-28 soit un précurseur de la SS-14 a été confirmée par plusieurs auteurs. En effet, le produit primaire de la traduction du message de la SS est une préprosomatostatine de 116 acides aminés qui inclut la prosomatostatine et un peptide

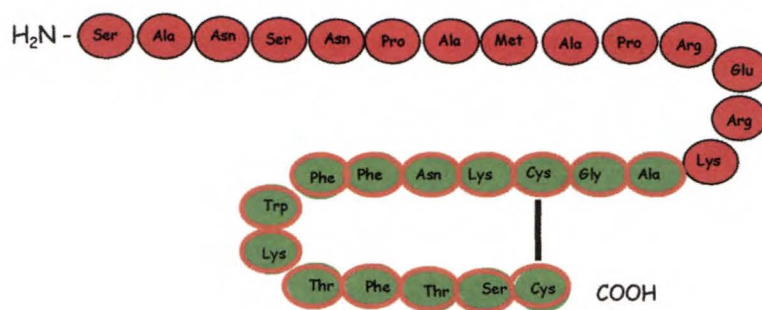
Figure 10 : Gène et produits du gène de la somatostatine. A. L'unité transcriptionnelle du gène de la SS est composée de deux exons de 238 pb et 367 pb séparés par un intron de 621 pb. La région régulatrice en 5' du site d'initiation de la transcription contient des éléments régulateurs de la transactivation du gène. Parmi les plus importants, une boîte TATA, un élément de réponse à l'AMPc (CRE) et deux éléments tissu- spécifiques (TSE I et TSE II). Le promoteur du gène de la somatostatine contient également deux éléments proximaux répresseurs de la transcription (SMS-PS). Modifié de Patel YC, 1999. B. Les deux formes biologiquement actives de la somatostatine sont le SS-14 et la SS-28, la SS-28 étant une extension N-terminale de la SS-14. La structure cyclique en C-terminale de la SS est indispensable à son activité biologique. Tiré de Patel YC, 1999.

A



B

SS-28



SS-14

signal de 24 acides aminés. A ce jour, le processus le plus commun pour aboutir à la formation de peptides matures à partir d'un précurseur peptidique implique le clivage protéolytique sur des résidus d'acides aminés mono et dibasiques de ce précurseur (Schwartz, 1986). Ainsi, le clivage protéolytique de la prosomatostatine humaine sur les résidus dibasiques (Lys⁻¹, Arg⁻²) et sur un résidu monobasique (Arg⁻¹⁵) génère la SS-14 et la SS-28 qui sont actuellement les deux seules formes biologiquement actives de la SS (Gluschankof et al., 1984; Brakch et al., 2002). La spécificité tissulaire des endoprotéases responsables de ce clivage protéolytique explique la distribution tissulaire de la SS-14 et de la SS-28 comme par exemple la prédominance d'expression de la SS-14 dans le cerveau (Gluschankof et al., 1984) ou encore de la SS-28 dans la muqueuse intestinale (Beinfeld et al., 1989). De plus, des études ont démontré un mécanisme de maturation différentielle aboutissant à l'expression de SS-14 dans les cellules gastriques et pancréatiques chez le rat et le chien (Patel, 1983; Chiba et al., 1988). Ainsi la production de SS-14 et SS-28 est à la fois quantitativement et qualitativement tissu-spécifique (Brakch et al., 2002).

2-4-3 Régulation de l'expression de la somatostatine pancréatique

A date, parce que les études tentant d'identifier et de caractériser les éléments cis-régulateurs qui participent au contrôle de l'expression du gène de la somatostatine ont été effectuées principalement sur des lignées cellulaires dérivant de tumeurs pancréatiques endocrines, la régulation du gène de la somatostatine est bien connue et détaillée. L'unité transcriptionnelle du gène de la somatostatine de rat possède 2 exons de 238 pb et 367 pb séparés par un intron de 621 pb (Montminy et al., 1984).

La région 5' possède de nombreux éléments cis-régulateurs : une boîte TATA, un élément de réponse à l'AMP cyclique CRE (cAMP response element), deux éléments proximaux tissu-spécifiques TSE I et TSE II (Tissue-specific element I and II) et deux éléments silencieux SMS-PS (Somatostatin promoter silencer element). Même si ces éléments sont capables de transactiver seuls l'expression du gène de la somatostatine, le plus souvent cependant, c'est une action synergique entre deux éléments cis-régulateurs qui est à l'origine d'une expression optimale de la SS aussi bien à l'état basal qu'induit. Parmi les facteurs de transcription connus et importants pour l'expression du gène de la SS, il y a CREB (CRE binding protein) et Pdx-1.

** Transactivation du gène de la SS pancréatique via l'élément cis-régulateur CRE :*

La cellule répond aux stimuli de l'environnement par des changements intracellulaires spécifiques au type d'induction. Les nombreux stimuli impliquent une activation des voies mettant en jeu la mobilisation de seconds messagers qui changent le taux de transcription des gènes cibles. De nombreux signaux extracellulaires sont transmis jusqu'au noyau par des voies qui activent des protéines kinases résultant de la phosphorylation de facteurs de transcription qui vont réguler l'expression de gènes (Hunter and Karin, 1992). Parmi ces voies, la voie dépendante de l'AMPc connue pour transactiver de nombreux gènes dont celui de la SS. Pour ce faire, les gènes doivent contenir l'élément de réponse à l'AMPc, CRE.

L'AMPc lie les 2 sous-unités régulatrices de la protéine kinase A (PKA), à raison de deux molécules d'AMPc par sous-unité. Ceci induit un changement

conformationnel de la kinase qui libère alors ses deux sous-unités catalytiques devenues actives. Elles transloquent au noyau et vont phosphoryler une protéine cible de 43 kDa, la protéine de liaison à CRE (CREB) sur son résidu tyrosine 133. Phospho-CREB lie alors l'élément cis-régulateur CRE sur une séquence consensus palindromique TGACGTCA (Montminy et al., 1986; Zhu et al., 1989). Le recrutement d'une protéine de liaison à CREB appelée CBP (CREB Binding Protein) joue le rôle de co-activateur moléculaire pour la liaison de CREB au complexe de la machinerie transcriptionnelle (Kwok et al., 1994). Ceci permet la transactivation du gène de la SS et aboutit ainsi à l'expression du messenger de l'hormone.

Parmi les cellules de lignées pancréatiques cancéreuses étudiées, certaines ont une expression basale importante de SS dont les cellules RIN-14B et les cellules Tu6. Il a été démontré que cette expression basale de SS ne dépend pas toujours de l'AMPc. En effet, l'élément CRE ne fonctionne pas toujours en réponse à l'AMPc mais plutôt de façon constitutive aboutissant ainsi à un niveau basal élevé de l'expression du gène de la SS. L'habilité de CRE à promouvoir une activité basale sans stimulation suggère un mécanisme de transactivation différent à l'état basal et à l'état induit. En effet, Leonard et al., 1992 ont démontré que l'activité basale du promoteur du gène de la SS résultait de l'action synergique de CREB et d'un facteur de transcription de la famille LIM, la protéine Isl-1 (Karlsson et al., 1990). Cette transactivation ne requiert pas la phosphorylation de CREB sur la sérine 133 par la protéine kinase A, puisqu'une mutation de cette sérine en alanine n'altère pas l'activité du promoteur. Par contre, même non phosphorylé, CREB est indispensable puisque son immunodéplétion abolit toute transactivation du promoteur. De même,

Isl-1 seul ne permet pas la transactivation puisque la délétion de sa séquence consensus de liaison empêche toute activité du promoteur (Leonard et al, 1992).

Vallejo et al. ont caractérisé l'élément *cis* reconnu par Isl-1 appelé SMS-UE (somatostatin- gene upstream element) dans la lignée pancréatique produisant la somatostatine RIN 1027 B2. SMS-UE possède deux domaines A (-113 à -107 bp en amont du site d'initiation) et B (-88 à -96). Le domaine B contient le site consensus de liaison à Isl-1, une séquence palindromique CTAATG adjacente à CRE, permettant ainsi l'action synergique de ces deux éléments cis-régulateurs en condition basale (Vallejo M et al., 1992a et 1992b). SMS-UE est reconnu comme un mini-enhancer spécifique du pancréas.

** Transactivation du gène de la SS pancréatique via les éléments cis-régulateurs TSE I et TSE II :*

Le facteur de transcription Pdx-1 (Pancreatic Duodenal homeobox-1) aussi connu sous le nom de STF-1 (Somatostatin Transactivating Factor; Leonard et al., 1993) ou IDX-1 (islet/duodenum homeobox-1; Miller et al., 1994) ou encore IPF-1 (insulin promoter factor 1; Ohlsson et al., 1993) est une protéine à homéodomaine orpheline car à date aucun récepteur ne lui a été caractérisé. Elle joue un rôle déterminant dans le développement pancréatique puisqu'elle est exprimée dans les cellules endothéliales précurseurs du pancréas exocrine et endocrine. En effet, la délétion du gène STF-1 (Knock out) résulte en une absence congénitale du pancréas (Jonsson et al., 1994). Bien qu'initialement présente dans les deux composantes du pancréas lors du développement, l'expression de Pdx-1 devient progressivement

restreinte dans 100 % des cellules β et dans 15 % des cellules δ (Guz et al., 1995). Dans ces cellules, Pdx-1 joue un rôle dans le maintien de l'expression des gènes de l'insuline et de la somatostatine respectivement. Il a été démontré que Pdx-1 régule l'expression du gène de la somatostatine via sa liaison sur les éléments tissu-spécifiques TSE I et TSE II à la fois *in vivo* et *in vitro* en tant que monomère et hétérodimère respectivement (Leonard et al., 1993; Peers et al., 1995). La transactivation du gène de la somatostatine requiert la liaison de Pdx-1 avec un co-facteur appartenant à la famille des protooncogènes Pbx (Dutta et al., 2001). La liaison n'est possible uniquement que par la présence d'un motif de 5 acides aminés FPWMK conservé chez ces protéines à homéodomaines homologues à la protéine extradenticle (EXD) de *Drosophila melanogaster*. L'hétérodimère ainsi formé aurait une spécificité accrue pour TSE II. La transactivation du gène de la SS par ce mécanisme est importante lors du développement pancréatique fœtal (Peers et al., 1995).

L'élément SMS-UE décrit plus haut est aussi connu comme étant un élément bipartite composé d'un domaine UE-A (-113 à -100) et du TSE I (-85 à -99) qui lie Pdx-1 comme monomère (Leonard et al., 1993; Miller et al., 1994). L'élément UE-A est un élément régulateur consensus du promoteur du gène de la SS qui n'a cependant pas de capacité de transactivation intrinsèque. Il a la capacité de potentialiser l'activité de transactivation du TSE I contigu lorsqu'il est reconnu par un hétérodimère formé de Pbx et d'un co-facteur Prep1 et que TSE I est lui aussi reconnu par Pdx-1 (Goudet et al., 1999). Cependant cette transactivation du gène de la SS via TSE I ainsi effectuée est toute différente de celle effectuée via TSE II. Dans le cas

impliquant TSE II, c'est la formation de l'hétérodimère Pdx-1/Pbx qui est important grâce au motif FPWMK (Peers et al., 1995). Dans celui impliquant TSE I c'est la synergie entre UE-A reconnu par l'hétérodimère Pbx/Prep1 et TSE I reconnu par Pdx-1 seul qui va permettre la transactivation optimale du gène de la SS (Goudet et al., 1999).

2-4-4 Effets physiologiques de la somatostatine

Les actions de la somatostatine sont médiées par des récepteurs à somatostatine SST à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. A ce jour, 5 types de SST ont été caractérisés avec deux-sous types SST2a et SST2b. Ils sont présents dans de nombreux tissus et l'expression de plusieurs au sein d'une même cellule n'est pas rare. La SS-14 et la SS-28 lient avec la même affinité les SST1-4, alors que la SS-28 lie préférentiellement le SST-5 (Patel and Skribant, 1994). La physiologie des récepteurs SST est exhaustivement détaillée dans la revue de Patel, 1999.

Parce que les deux formes biologiques de la SS (SS-14 et SS-28) peuvent être produites par deux types cellulaires distincts, des neurones et des cellules endocrines, elles agissent comme neurotransmetteurs et comme régulateurs paracrines et/ou autocrines et/ou systémiques respectivement.

En plus de sa fonction principale de réguler la sécrétion de l'hormone de croissance, la SS agit dans le système nerveux comme neuromodulateur influençant

l'activité locomotrice (Epelbaum, 1986) et les fonctions cognitives (Schettini et al., 1988).

Dans le tractus gastro-intestinal, la SS a de nombreuses cellules cibles sur lesquelles elle agit de façon paracrine. Elle y exerce un effet inhibiteur sur la sécrétion exocrine et endocrine pancréatique et gastrique, sur la motilité intestinale, sur l'absorption des nutriments, la vasoconstriction, et enfin sur la prolifération cellulaire duodénale et pancréatique.

Suite à l'ingestion de nutriments, la SS-14 et la SS-28 sont retrouvées dans la circulation mais seule la SS-28 agit de façon systémique. En effet, les études de Ensink ont démontré que chez l'homme, la SS-28 inhibe en partie la sécrétion pancréatique exocrine depuis sa sécrétion par les cellules de la muqueuse intestinale (Ensink et al., 1989). L'infusion de SS-28 exogène mimant un effet post-prandial inhibe également la sécrétion des enzymes pancréatiques lipase, trypsine et amylase chez l'homme (Hildebrand et al., 1992) mais également la sécrétion endocrine des cellules bêta pancréatiques humaines (D'Alessio et al., 1989).

La SS-14 agit localement de façon paracrine dans l'estomac. Il existe une étroite relation anatomique entre les cellules D et les cellules G à gastrine du fait du long prolongement cytoplasmique des cellules D suggérant ainsi une relation fonctionnelle entre les deux types cellulaires. Plusieurs études effectuées *in vivo* et *in vitro* chez le rat ont démontré que la SS était capable d'inhiber la sécrétion de gastrine via un effet local paracrine directement dans l'environnement interstitiel des cellules G (Harty et al., 1981; Chiba et al., 1981; Wolfe et al., 1984). De plus, il a été

démontré que la SS inhibait la croissance des cellules de la muqueuse intestinale chez le rat par un mécanisme pouvant impliquer la suppression de la libération de gastrine (Dembinski et al, 1987).

L'effet antiprolifératif de la SS a également été mis en évidence *in vivo* chez le rat dans une étude où la croissance pancréatique préalablement stimulée par la caéruléine était inhibée par l'injection du peptide (Morisset, 1984). D'autres études ont démontré que cet effet antiprolifératif sur le pancréas était tout aussi efficace sur la croissance duodénale chez le rat en utilisant un analogue de la somatostatine. (Rivard et al., 1991). Des études plus récentes ont démontré que dans le pancréas humain, l'effet antiprolifératif de la SS était médié via le récepteur de la SS de type 2 (SST-2) (Kikutsuji et al., 2000).

La somatostatine exerce aussi un effet inhibiteur sur la sécrétion des hormones pancréatiques insuline et glucagon. La SS-14 semble être la forme physiologique potentielle pour l'inhibition de la sécrétion de glucagon alors que l'insuline est inhibée principalement par la SS-28 (Mandarino et al., 1981; D'Alessio et al., 1989). L'utilisation d'agonistes et d'antagonistes spécifiques aux différents récepteurs de la somatostatine sur des îlots purifiés de souris a permis d'identifier les types de récepteurs impliqués dans l'inhibition de la sécrétion des hormones. Ainsi, chez les rongeurs, la somatostatine inhibe la sécrétion du glucagon via le SST 2 (Strowski et al., 2000; Cejvan et al., 2003) alors que via le SST5 elle inhibe la sécrétion d'insuline (Strowski et al., 2000; Strowski et al., 2003). Ces études

démontrent à la fois des effets paracrines locaux mais aussi endocrines de la SS sur les autres hormones pancréatiques.

2-5 Pathologie de l'îlot de Langerhans : le diabète

2-5-1 Les types de diabète

Le diabète est un syndrome lié à l'existence d'une hyperglycémie soutenue. Ainsi selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) une glycémie plasmatique de 11mmol/L mesurée au hasard dans la journée et une glycémie plasmatique supérieure à 7.8 mmol/L chez le sujet à jeun sont les deux critères pour diagnostiquer un diabète. Les deux principaux types de diabète sont le diabète de type I ou diabète mellitus insulino-dépendant et le diabète de type II ou non - insulino -dépendant.

*** Diabète non-insulino-dépendant**

Ce type de diabète communément appelé diabète de type 2, anciennement nommé diabète "gras" ou diabète de la maturité, survient souvent après la quarantaine chez des personnes en surpoids. Sa prévalence est élevée, 10%, ce qui représente environ 190 millions de personnes dans le monde. Il résulte de l'association de deux anomalies interdépendantes : une insulino-résistance, c'est-à-dire une perte de sensibilité des cellules cibles de l'organisme à répondre au signal insulinique surtout le tissu adipeux, le foie et les muscles (Korc, 2003) et une perte de la capacité des cellules bêta de sécréter l'insuline lors d'une hyperglycémie.

Une partie importante du traitement consiste à adopter un mode de vie plus sain, en pratiquant un sport et en absorbant à heures régulières une alimentation équilibrée et peu calorique.

* Diabète insulino-dépendant :

Il y a quelques années, on appelait ce diabète : diabète maigre ou diabète consomptif. On définissait donc ce diabète par son évolution grave (amaigrissement massif). Actuellement on préfère une appellation plus neutre : TYPE 1. Environ 5 à 10 % des diabétiques souffrent du type insulino-dépendant, il peut apparaître à tout âge, mais il se manifeste souvent pendant l'enfance ou au début de l'âge adulte, d'où son autre appellation de diabète juvénile (Devendra et al., 2004). Les personnes atteintes de ce type de diabète produisent très peu ou ne produisent pas du tout d'insuline. En effet, le système immunitaire par un processus auto-immun détruit spécifiquement les cellules bêta de l'îlot de Langerhans par un mécanisme qui impliquerait les lymphocytes T (Roep et al., 1999). L'auto antigène aurait une structure similaire à celle du virus Cocksackie B (Mandrup-Poulsen, 1998; Redondo and Eisenbarth, 2002).

Jusqu'à présent, il n'a pas été possible de fabriquer une insuline qui serait active par voie orale, parce qu'elle est détruite par les sucs digestifs, dans l'estomac en particulier. Il n'existe donc pas d'insuline en comprimés, la forme injectable est la seule voie disponible actuellement. Il existe un grand nombre d'insuline fabriquée par le génie génétique. Elles sont classées selon leur durée d'action qui peut aller de 40 minutes pour les insulines dites Ultrarapides qui « désucrent le repas » et jusqu'à 30

heures pour celles dites ultra lentes. Dans notre étude, nous avons utilisé l'insuline biosynthétique humaine lente NPH (Neutral Protamon Hagedorn) de la firme Novo Nordisk. Elle débute son action une heure environ après l'injection et sa durée d'action peut aller jusqu'à 16 heures.

* Les autres types de diabètes

Le diabète de type 3 est une maladie systémique autre qui apporte une destruction du pancréas. Cette pathologie peut être causée par des pancréatites chroniques, certaines réactions défavorables à des médicaments ou à un défaut familial typique de certains récepteurs responsables de l'efficacité de l'insuline. Il faut noter que le diabète de type 3 est beaucoup plus rare.

Le terme de diabète gestationnel ou GDM (Gestational Diabetes Mellitus) est réservé à toute femme enceinte dont l'hyperglycémie se manifeste vers le milieu de la grossesse. Il affecte 2 à 5 % des femmes enceintes. Souvent, il disparaît après l'accouchement, mais on estime que près de 40 % des femmes développeront un diabète non insulino-dépendant.

2-5-2 Métabolisme glucidique et lipidique au cours du diabète

Donc le diabète est dû, dans des proportions variables, à un déficit relatif ou absolu en insuline et à une résistance à l'insuline. Par conséquent, les voies métaboliques stimulées par l'insuline sont totalement ou partiellement inactivées et à l'inverse les voies réprimées normalement par l'hormone seront activées. Ainsi l'incapacité de l'insuline à stimuler le transport du glucose, la néoglucogenèse d'une

part et son incapacité à inhiber la glycogénolyse d'autre part aura pour effet l'accumulation du glucose dans le sang, c'est l'hyperglycémie. La dégradation des graisses induites elle aussi par la carence en insuline aura pour conséquence une accumulation d'acides gras dans le sang ou hyperlipidémie, puisque d'une part la lipoprotéine lipase sera inactive et que d'autre part, la triglycéride lipase sera activée menant à une lipolyse accrue. Ceci résultera aussi en une perte de poids observée au cours du diabète de type I.

2-5-3 Altération de la physiologie pancréatique de la somatostatine au cours du diabète

Malgré les nombreuses études effectuées principalement durant les années 1970, les résultats concernant les changements métaboliques de la cellule delta pancréatique au cours du diabète restent contradictoires.

Plusieurs études ont démontré que les contenus en SS pancréatique augmentaient significativement chez le rat rendu diabétique par la streptozotocine (rats-STZ) (Patel and Weir, 1976; Patel et al., 1978; Makino et al., 1977). Cette augmentation est progressive lors du développement du diabète. Une étude morphométrique effectuée sur des îlots purifiés de rats-STZ a montré une augmentation des contenus en SS de 45 %, 230 % et 500 % au bout de 2 semaines, 6 semaines et 6 mois de diabète respectivement (Patel et al., 1978). Cette même étude a démontré que les contenus en SS gastrique étaient eux aussi significativement augmentés comparativement aux animaux normaux. Par contre, les cellules à somatostatine de l'hypothalamus ne montraient aucune variation des contenus. Ces

résultats ont été confirmés par Makino qui a démontré que les contenus en SS hypothalamique n'étaient pas altérés au cours du diabète chez le rat-STZ (Makino et al., 1977). Ces résultats suggèrent une régulation tissu-spécifique de la SS. En effet, l'expression de la SS dans le pancréas et l'estomac augmente de 2 à 3 fois chez le rat-STZ par rapport à celle des animaux contrôles, mais ne change pas dans l'hypothalamus, le cortex cérébral et la muqueuse intestinale (Papachristou et al., 1989).

Les changements métaboliques de la cellule delta pancréatique chez le sujet diabétique impliquent également la régulation du nombre des cellules à somatostatine. Des analyses morphométriques effectuées sur des pancréas humains diabétiques insulino-dépendant et de rat-STZ (16 mois de diabète) ont démontré une augmentation de 2 fois du nombre de cellules delta par pancréas et de 2.5 fois le volume des cellules delta comparativement à des pancréas de sujets et de rats non diabétiques. Ceci suggère une hyperplasie et une hypertrophie des cellules delta respectivement (Orci et al., 1976). Les mêmes résultats ont été démontrés par immunohistochimie chez le rat-STZ (Matsushima et al., 1978).

Les travaux de Hara ont quant à eux démontré une augmentation de la sécrétion basale ou induite par l'arginine de la SS pancréatique à partir de pancréas perfusés de rats rendus diabétiques par l'alloxane, comparativement au pancréas de rat normaux (Hara et al., 1979).

Cependant, d'autres études effectuées sur des souris spontanément diabétiques dites db/db et ob/ob ont montré des résultats différents. En effet, chez ces souris, les

contenus en SS pancréatique et gastrique ainsi que le nombre de cellules delta dans l'îlot avaient diminué. Par contre, la SS hypothalamique se retrouve élevée. (Patel et al., 1976; Patel et al., 1977).

3- Modèles d'étude

3-1 Modèles animaux

Bien que le terme *modèle animal* soit très employé, il peut être utile de le définir pour permettre de mieux comprendre les contextes où il apparaît. *L'American National Research Council Committee on Animal Models for Research and Aging* a formulé la définition suivante : « *En recherche biomédicale, un modèle animal est un modèle permettant l'étude de données de référence sur la biologie ou le comportement ou chez lequel on peut étudier un processus pathologique spontané ou induit, celui-ci ayant un ou plusieurs aspects communs avec un phénomène équivalent chez l'humain ou d'autres espèces animales.* » [Traduction].

Les modèles animaux employés en recherche biomédicale, et particulièrement ceux qui servent à l'étude des maladies et autres affections touchant les humains, dans notre cas le diabète, peuvent être classifiés comme suit :

* *Modèles naturels (parfois qualifiés de « spontanés »)*

La maladie se présente naturellement chez les animaux et est identique à des maladies ou affections humaines. Les modèles suivants sont étudiés pour leur

spontanéité à développer un diabète insulino-dépendant ou non insulino-dépendant : le rat BB (*Wistar Bio Breeding*) ainsi que la souris NOD (Non-Obese Diabetic) sont considérés comme de bons modèles du diabète juvénile spontané chez l'homme (Ramanathan et al, 2001; Polychronakos, 2004). La souris ob/ob présente un défaut dans le gène de la leptine. La souris db/db et la rat fa/fa (Zucker diabetic fatty) ont une mutation dans le récepteur de la leptine. Ces modèles animaux sont très intéressants pour l'étude du diabète de type II présentant une obésité (Chemineau et al., 1999). La souris obèse jaune, le rat Wistar GK (*Goto & Kakisaki*), le hamster Chinois (*Cricetulus griseus*), la souris NZO (*new zealand obese*) , le rat eSS, le lapin blanc de Nouvelle-Zélande, la souris KK présentent eux aussi un diabète non-insulinodépendant.

* *Modèles expérimentaux*

Modèles chez lesquels les scientifiques reproduisent expérimentalement une affection ou une maladie par l'utilisation de substances chimiques dans notre cas diabéto-gènes. Ces substances sont toxiques pour la cellule bêta. Les plus utilisées sont l'alloxane et la streptozotocine (isolée de la moule *Streptomyces achromogenes*). Ayant une structure apparentée au glucose, la streptozotocine pénètre dans la cellule bêta par le transporteur GLUT-2 et par un processus d'alkylation de l'ADN elle détruit spécifiquement les cellules bêta (Szkudelski, 2001). L'alloxane agirait davantage par un processus engendrant une augmentation du calcium intracellulaire et la production de radicaux libres. Des études ont démontré que la streptozotocine était un meilleur agent diabéto-gène que l'alloxane. En effet, les taux

d'hyperglycémie et d'hyperlipidémie induits par ce dernier peuvent être réversibles dans le temps (Gaulton et al., 1985; Islas-Andrade et al., 2000). Dans le cadre de notre étude nous avons induit le diabète de type I avec la streptozotocine (STZ). De nombreuses recherches ont permis d'établir le mode d'administration et les doses efficaces pour induire un diabète permanent avec la STZ. Ainsi une seule injection intrapéritonéale à une dose de 50 à 70 mg /kg poids corporel suffit pour induire un diabète permanent chez l'animal adulte (Szkudelski, 2001).

3-2 Modèles cellulaires

L'avantage de l'utilisation des lignées cellulaires en culture est que les influences neuronales et circulatoires sont éliminées. Ainsi toute possibilité d'effet indirect via l'innervation extrinsèque ou intrinsèque ou encore la relâche de facteurs intermédiaires par la circulation ou les milieux interstitiels est exclue. De plus, elle permet l'étude de cellules isolées pour lesquelles il est quasi impossible de le faire *in vivo*. Le pancréas endocrine est une structure complexe composée d'au moins quatre types cellulaires. Jusqu'à ce jour, il est encore très difficile d'isoler et de purifier un type cellulaire de l'îlot normal. Bien que plusieurs techniques d'isolation des îlots soient efficaces et que des progrès sur leur purification soient remarquables, seules les cellules bêta présentent un intérêt du fait de leur implication directe dans le processus du diabète. Ces techniques visent essentiellement à l'amélioration du traitement du diabète par la transplantation d'îlots selon le Protocole d'Edmonton (Oberholzer et al., 2001). Beaucoup d'études ont permis de mettre au point les conditions optimales permettant une survie prolongée de l'îlot capable de conserver

ses capacités sécrétrices (Ilieva et al., 1999a et b ; Wang and Rosenberg, 1999; Gaber et al., 2001; Hyon and Kim, 2001). Cependant il est encore très difficile de maintenir les fonctions endocrines très longtemps en culture.

Etant donné les limites dans l'utilisation des îlots purifiés en culture, beaucoup de travaux ont été effectués afin d'établir des lignées cellulaires pancréatiques endocrines stables de rongeurs (Ulrich et al., 2002). Parmi ces lignées, la lignée cellulaire RINm est issue de cellules bêta tumorales irradiées de rat qui synthétisent et produisent l'insuline (Gazdar et al., 1980). La lignée RIN-14B est issue d'un clone dérivé de la lignée RINm. Les cellules RIN-14B sécrètent presque exclusivement la somatostatine et s'avèrent être un bon outil pour étudier la régulation de l'expression du gène de la somatostatine (Bhathena et al., 1984). D'autant plus que ces cellules requièrent une concentration supra physiologique de glucose pour croître, mimant donc une hyperglycémie commune au diabète. Il y a plusieurs avantages à utiliser une lignée cellulaire endocrine. La possibilité de pouvoir mesurer la production, l'expression et la sécrétion de l'hormone dans le milieu de culture en testant une variété de facteurs et de sécrétagogues potentiels. Les cellules peuvent également être transfectées afin d'étudier la régulation d'un gène. Cependant, les lignées cellulaires transformées peuvent au fur et à mesure de leur passage parfois se différencier ou développer une résistance à une réponse physiologique. Il est donc important de toujours considérer que l'étude sur une lignée cellulaire ne représente pas toujours le contexte physiologique dans lequel la cellule se trouve *in vivo*.

4- Problématiques et objectifs

En résumé, nous retenons que les changements métaboliques de la cellule delta pancréatique qui surviennent au cours du développement du diabète suggèrent un rôle de la somatostatine dans la physiologie de l'îlot mais aussi un rôle de l'insuline sur la physiologie de la cellule delta pancréatique. Par contre, jusqu'à ce jour toutes les études effectuées pour caractériser les changements métaboliques de la cellule delta pancréatique survenant lors du diabète sont contradictoires. En effet, certains auteurs ont démontré une augmentation de l'expression et des contenus de la somatostatine associée à une hypertrophie et une hyperplasie des cellules delta pancréatiques diabétiques (Patel et al., 1976; Orci et al., 1976; Makino et al., 1977; Patel et al., 1978; Matsushima et al., 1978; Papachristou et al., 1989). D'autres au contraire ont démontré que l'expression et les contenus en somatostatine pancréatique diminuaient chez des animaux spontanément diabétiques, les souris ob/ob et db/db (Patel et al., 1976; Patel et al., 1977). De plus, les effets de l'insuline sur certains aspects physiologiques de la cellule delta pancréatique, notamment sa sécrétion, sont eux aussi très controversés puisque dans certains cas l'insuline stimule la sécrétion de somatostatine (Honey and Weir, 1979; Eilertson et al., 1995) ou l'inhibe (McEvoy, 1981; Rouiller et al., 1981; Gerber et al., 1981; Murakami et al., 1982; Schaffer et al., 1985; Ribes et al., 1988) ou encore, n'a pas d'effet (Patton et al., 1977; Weir, 1979; Patel et al., 1979).

A la lumière de tous ces résultats, nous constatons qu'il n'y a pas eu d'études récentes pour renforcer l'un ou l'autre des effets de l'insuline sur le métabolisme de la

somatostatine pancréatique d'une part. D'autre part, aucun mécanisme n'a jamais été mis en évidence pour expliquer l'effet insulinique sur la physiologie de la somatostatine pancréatique à l'état normal et au cours du diabète.

L'objectif de cette étude a donc été de déterminer les changements métaboliques de la somatostatine pancréatique au cours du diabète et suite à une insulinothérapie puis d'identifier la/les voie(s) de signalisation(s) empruntée(s) par l'insuline pour aboutir aux effets observés.

Le chapitre suivant présente sous formes d'articles les matériels et méthodes utilisés pour parvenir à nos objectifs ainsi que les résultats obtenus.

II- MATERIEL ET METHODES/ III- RÉSULTATS

Article 1 : Julien S, Laine J, Morisset J. Letter to the editor : modified technique to isolate pancreatic islets from diabetic rats after its induction by streptozotocin. Pancreas. 27: 206-7, 2003.

To the Editor: A rapid survey of the literature indicates that most of the studies performed on isolated islets from rat, mice or human pancreas dealt with culture conditions (1) and secretion of the different hormones (2). The presence of some specific receptors was also investigated (3). The recent development of antibodies raised against specific receptors believed to be present on certain islet cells led to some controversies. As an example, colocalization of the CCK_B receptor with glucagon was described in human glucagon cells (4) whereas this same receptor was also located on human, mice, pig and rat delta cells (5).

Over the last decade, obesity and diabetes have exploded in the developed countries and these pathologies are discovered now a day in more and more young patients. These frightful epidemiological data will favor increased research on islets transplantation and on mechanisms involved in the interrelationship existing between the different cells of the islet.

In that line of thinking, we recently studied the effects of streptozotocin-induced diabetes on alterations of rat CCK_A and CCK_B receptors and somatostatin expression (6). Contrary to the data recently presented by Balamurugan (7) who experienced major difficulties in obtaining a reasonable yield of rat pancreatic islets from streptozotocin-diabetic rats, our modifications of the Lacy and Kostianovsky's method (8) gave us an average of 350-400 islets/pancreas after 3 weeks of diabetes compared to a yield of 650-800 islets from a normal pancreas.

In an effort to serve the scientific community in this specific area of pancreatic physiology related to diabetes, we present herein a detailed description of the procedure set up to optimize yields of pancreatic islets purification from diabetic rats.

Fasted rats were rendered diabetic by a single I.P. injection of streptozotocin, 65 mg kg^{-1} , dissolved in 0.1 M citrate buffer, pH 4.5; control animals received the citrate solution. After 21 days of diabetes, rats were treated as follows: after anaesthesia with Somnotol (1 ml/100 g BW of a 6 mg ml^{-1} solution), the distal pancreatic duct was ligated, the common bile duct cannulated, and the pancreas was perfused with 20 ml of Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS, Gibco BRL). The perfused pancreas was excised and cut in very small particles with scissor. After 2 washes in HBSS, the pieces of pancreas were centrifuged at low speed, the supernatant removed and the pellet weighted. Islets were then isolated from surrounding exocrine tissue by digestion with collagenase (15 mg/g pancreas, Sigma) and DNase I (0.5 mg/g pancreas, Sigma) in HBSS at 37°C by manual and mechanical shaking during 5 minutes. After 2 washes in HBSS containing 10% FBS by centrifugation at 315g for 2 min at 4°C , the islets were incubated 20 min at 4°C in Eurocollins supplemented with 2% FBS. After a centrifugation at 300g, 2 min at 4°C , the pellet was homogenized through an 18 G needle in the first density gradient $d: 1.108$. Purification was achieved by density gradient prepared in a four-step Euro Ficoll 400 gradient: $d: 1.108/1.098/1.069/1.034$. After centrifugation at 505g, 11 min at 4°C , islets were collected at interface 1.069/1.034, washed twice in HBSS containing 10% FBS by centrifugation at 200g, 2 min at 4°C . Harvested islets were plated in 60 mm Petri dishes containing RMPI 1640 medium supplemented with 10%

heat FBS, 11 mM glucose, penicillin (100 U ml^{-1}), streptomycin ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) and DNase ($250 \mu\text{g ml}^{-1}$) and cultured at 26°C in 5% CO_2 overnight.

For islet's preparation of normal rats, the following modifications were performed. After the enzymatic digestion, the preparation was washed three times for 2 min at 4°C by successive centrifugation at 315g, 90g and 35g, respectively. The digested pellet was then homogenized through a 14G stainless steel needle and the islets were collected between interface d: 1.098/1.069 of the Euro Ficoll 400 gradient.

The success of both procedures is demonstrated in Fig. 1 where islets prepared from normal and diabetic rats are presented. Indeed, by confocal microscopy, islets from normal pancreas are loaded with insulin, contain a sizable amount of glucagon and much less somatostatin. The transmission micrographs let us appreciate the size of each islet. On the contrary, islets from diabetic rats show a tremendous reduction in insulin; have glucagon cells which are more compact but with comparable amount of hormone as the control islets, and an evident enrichment in somatostatin also in compact cells; the increase in total somatostatin content reached 84% after 3 weeks of diabetes (6). The diabetic islet is about 10 times smaller than the size of a normal islet as evaluated by transmission microscopy (Fig. 1). Finally, 650-800 islets from one normal pancreas contain an average of $30 \mu\text{g}$ protein and $6 \mu\text{g}$ RNA, whereas those of a diabetic pancreas (350-400 islets) yield $4.5 \mu\text{g}$ protein and $2.5 \mu\text{g}$ RNA.

These data clearly indicate that a modified Lacy and Kastianovsky's procedure (8) can yield respectable amounts of purified islets from a rat diabetic pancreas contrary to what was previously observed (7). These islets can be used for estimation

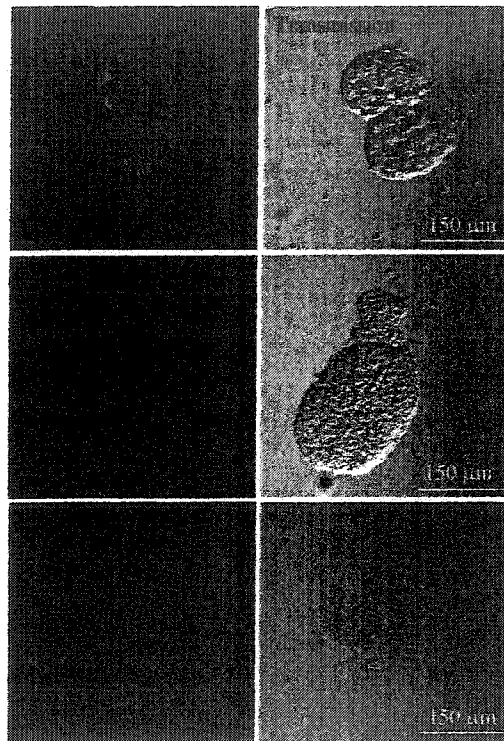
of hormone contents, for their secretion and synthesis, for colocalization of specific receptors and hormones and for differentiation and regeneration studies.

Acknowledgement: This work was supported by grant GP6369 from the Natural Sciences and Engineering Council of Canada. We also thank Mrs Ghristiane Gauvin for secretarial assistance and Dr Abou Elela for use of his confocal microscope.

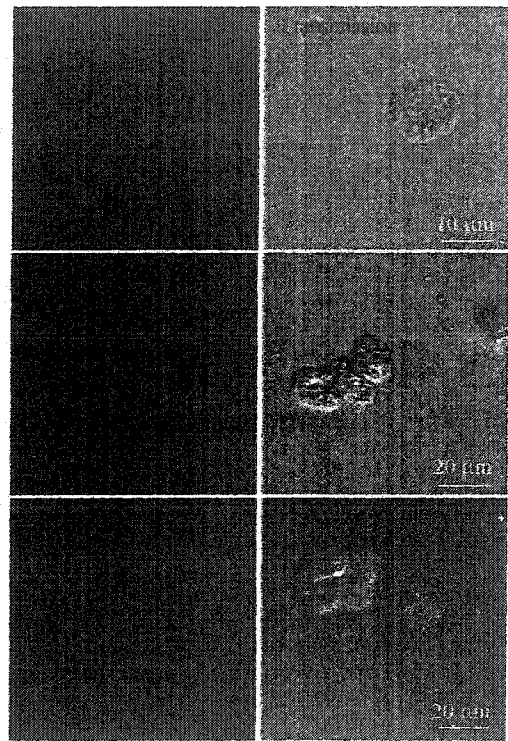
Figure 1. Confocal microscopy images from normal and diabetic rat purified islets.

Islets were incubated overnight at 4°C with the somatostatin antibody (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$), glucagon (1:500) or with insulin (1:50).

Normal islets



Diabetic islets



REFERENCES

1. Andersson A, Ericksson V, Ostenson CG. Glucagon production by cultured pancreatic islets: effects of different culture conditions and media. *In Vitro* 1981;17: 378-84.
2. Verspohl EJ, Ammon HPT. Cholecystokinin (CCK₈) regulates glucagon, insulin and somatostatin secretion from isolated rat pancreatic islets: interaction with glucose. *Pflugers Arch* 1987;410: 284-87.
3. Verspohl EJ, Hafner B, He X, Knittel JJ. Evidence for cholecystokinin receptor subtypes in endocrine pancreas. *Peptides* 1994;15:1353-60.
4. Saillan-Barreau C, Dufresne M, Clerc P et al. Evidence for a functional role of the cholecystokinin B/gastrin receptor in the human foetal and adult pancreas. *Diabetes* 1999;48:2015-21.
5. Morisset J, Wong H, Walsh JH et al. Pancreatic CCK_B receptor: their potential roles in somatostatin release and δ cell proliferation. *Am J. Physiol* 2000;279:G148-G156.
6. Julien S, Lainé J, Morisset J. Alterations in CCK_A and CCK_B receptors and somatostatin expression in streptozotocin-diabetic rats. *Pancreatology* 2002;2:276-77.
7. Balamurugan AN, Gu Y, Miyamoto M et al. Letter to the editor. *Pancreas* 2003;26:102-03.
8. Lacy PE, Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 1967;16:35-39.

II- MATERIEL ET METHODES/ III- RÉSULTATS

Article 2 : Julien S, Laine J, Morisset J. The rat pancreatic islets a reliable tool to study islet responses to cholecystokinin receptor occupation. Reg. Pept. (Sous presse).

**THE RAT PANCREATIC ISLETS
A RELIABLE TOOL TO STUDY ISLET RESPONSES
TO CHOLECYSTOKININ RECEPTOR OCCUPATION**

Sophie Julien, Jean Lainé and Jean Morisset
Service de gastroentérologie, dép. de médecine
Faculté de Médecine, Université de Sherbrooke
Sherbrooke, Qc, Canada J1H 5N4
Tel: (819) 820-6813 Fax: (819) 820-6826
e.mail: Jean.Morisset@USherbrooke.ca

Reprint Requests:

Dr Jean Morisset
Service de gastroentérologie, Dép. de médecine
Faculté de médecine, Université de Sherbrooke
Sherbrooke, Qc, Canada J1H 5N4

Key words: Pancreas, human, rat, CCK_B receptor, CCK_A receptor, somatostatin

This research was supported by grant GP6369 from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada

ABSTRACT

This study was undertaken to show that rat purified islets can be used as a reliable tool to study some aspects of human islet's physiology related to CCKR occupation. Therefore, isolated foetal, adult human and rat islets were compared for 1) CCKR subtypes mRNA and protein expression and somatostatin (SS) mRNA; 2) Co-localization of these receptors with insulin, glucagon and SS. Finally, rat islets were tested for their responsiveness to stimulation. Purified human and rat islets were used for CCKR subtypes and SS mRNA estimation by RT-PCR and protein by Western blots. Receptors and hormones co-localizations were evaluated by confocal microscopy. Hormones secretion served to determine rat islets responsiveness. Islets of both species express CCK_A and CCK_BR mRNA and proteins and SS mRNA. The CCK_AR co-localizes with insulin and glucagon and the CCK_BR with SS. Insulin release was increased 5 fold in response to 16 mM glucose and SS secretion reached 1.3 and 1.7 fold increments above basal in response to forskolin and IBMX.

In conclusions, human and rat islets have comparable CCKR subtypes localized on the same cells; they also express SS mRNA. The rat islets are functional as they secrete but their response to hormonal stimulation remains to be clarified. These rats islets can thus serve as tools to study islets physiology.

1. INTRODUCTION

Since the molecular cloning of the rat CCK_A and human CCK_B receptors [1, 2], numerous studies were published on the expression of these two receptor subtypes in the pancreas of different species. By Northern blot analyses, the CCK_AR was identified in rat [1] and mouse [3] pancreas. Using the RT-PCR technique, a more sensitive method to detect lower abundance transcripts, the expression of CCK_AR was also detected in rat pancreatic islets [4] and human pancreas [5].

The presence of the CCK_BR in rodent pancreas has been controversial. Indeed, in rat and mouse, many investigators failed to detect its mRNA by Northern hybridization [3, 6, 7, 8]. However, its presence was confirmed by RT-PCR in both species (3, 4, 8). The human pancreas seems to have more abundant levels of CCK_BR than CCK_AR as determined by RT-PCR [9]; this observation may explain why the CCK_BR was much easier to detect in this species by Northern blot analysis [1, 5, 10].

With the development of specific antibodies raised against the CCK_A and CCK_B receptors, it became possible to characterize the proteins of these two receptors as well as their localization on the various cells of the endocrine and exocrine pancreas. By immuno-fluorescence, the CCK_AR was found on acinar cells of the rat and mouse pancreas but absent from those of the pig and human pancreas. This receptor was also found on rat, mouse and pig pancreatic beta cells [11]. By immunohistology, the CCK_AR appeared on porcine pancreatic alpha cells [12], a site different from that of two other studies locating the CCK_BR on human [13] and rat [14] pancreatic alpha cells; adding to the confusion, our immunofluorescence data

localized the CCK_B receptor on pancreatic delta cells of the rat, mouse, pig, human [8] and calf pancreas [15].

Our initial observations indicated that the CCK_BR was constantly associated with the somatostatin delta cells in rat, mouse, human, pig, calf, dog and horse pancreas [8, 16]. These data were obtained from freshly frozen pieces of pancreatic tissue in liquid nitrogen, of which frozen sections were made; the biochemical characterization of this CCK_BR protein from several species was always performed out of membranes prepared from whole tissue, including exocrine and endocrine glands.

As a result of this specific location of the pancreatic CCK_BR protein on the somatostatin delta cells, the challenging question was to find a functional role for gastrin through occupation of its CCK_B receptor on these cells. Our hypothesis stipulates that gastrin could be involved in secretion and/or synthesis of somatostatin as well as in the growth control of the delta cells.

Access to fetal and adult human pancreatic tissue is rather difficult and often very occasional in specialized centers devoted to abortion or organ transplantation. The human pancreatic component of this study was introduced to demonstrate that the human and rat pancreatic islets are quite comparable with regards to CCK receptor subtypes mRNAs and protein expression and localization so that they can be used indifferently wherever available to study islet physiology related to CCK receptors' occupation.

2. EXPERIMENTAL SUBJECTS AND ANIMALS:

Human pancreatic tissues were obtained from normal elective pregnancy terminations (fetus) or organ donors (adult). These studies were approved by the Institutional Human Subject Review Boards. Animals: Male Sprague-Dawley rats (340-360g) were purchased from Charles River Laboratories, St-Constant, Qc. Before sacrifice, they were housed in a light and humidity controlled room and given free access to food and water; they were fed when sacrificed. These animals were used according to our institutional animal care policies.

3. MATERIAL AND METHODS:

3.1 *Tissue preparations:*

Once excised, human fetal and adult, and rat adult pancreas were quickly frozen in liquid nitrogen and kept frozen at -80°C until they were processed either for Western blot analysis or RNA extraction.

3.2 *Rat islets isolation:*

After anesthesia with Somnotol (MTC Pharmaceutical, Cambridge, Ontario), the pancreatic islets were isolated using the collagenase digestion method of Lacy and Kostianovsky [17] as recently extensively described [18].

3.3 *Human fetal islets isolation:*

The fetal pancreas was washed in HBSS and cut in fine pieces with scissor in HBSS. After centrifugation, the pellet was digested in an HBSS solution containing 6 mg ml⁻¹ of collagenase by vigorous hand shaking at 37°C for 15 min. After two washes in

HBSS, 10% FBS, the islets were incubated in an Eurocollins solution, 2% FBS, at 4°C for 20 min and then collected at the second interface of a four-steps Ficoll 400 gradient after a 505 g centrifugation at 4°C for 10 min. About 6000 islets per pancreas (18 weeks fetus) were cultured as described for the rat islets.

3.4 Human adult islets isolation:

These adult human islets were generously given to us by Dr Lawrence Rosenberg, Montreal General Hospital, Montreal, Quebec. They were isolated according to his procedure described in [19].

3.5 Islets culture:

Harvested islets from rat and human (fetal, adult) pancreas were cultured in RMPI 1640 medium 10% FBS, 11 mM glucose as previously described [18].

3.6 Gel electrophoresis and immunoblotting:

This procedure was performed as described in [11]. In each experiment, proteins were estimated with the BCA assay of Pierce using bovine gamma globulin as a standard. 50 µg protein of whole homogenate, purified membranes and isolated islets were loaded on 10 or 12% SDS-polyacrylamide gels. After migration, gels were transferred to PVDF membranes and blocked 2h in TBST (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.14 M NaCl, 0.1% Tween-20), 6% non-fat dry milk. They were then probed overnight at 4°C in TBST-3% non-fat milk with either a polyclonal N-terminal CCK_B receptor rabbit antiserum (9262), a generous gift from Dr J. Walsh, CURE, Los Angeles, CA, or with a polyclonal N-terminal CCK_A receptor rabbit antiserum developed against the extreme N-terminus of the rat CCK_AR sequence (AR6). Also used was antibody 1122, a rabbit polyclonal to the carboxyl-terminal residues 410-

429 of the rat CCK_A receptor. Both antibodies were generously given by Dr M.L. Kruse, Kiel, Germany. The dilution of each antibody is indicated in each figure's legend. Specificity of each receptor and hormone antibody has been previously established by preincubation of each antibody with its specific antigen or hormone [15, 18]. The blots were then washed, incubated with the second antibody, washed again and developed with Lumi-Light Plus chemiluminescence substrate as described in [8]. Scanning and densitometry analysis were performed to establish receptor/actin ratios.

3.7 *Islet and pancreas RNA isolation:*

Total RNAs from rat purified islets and from human purified islets from fetal and adult pancreas were extracted by the method of Chomczynski [20]. Total RNA from rat pancreas was extracted according to the modified procedure of Chirgwin [21] as previously described [8].

3.8 *Reverse transcriptase polymerase chain reaction:*

RT-PCR was performed using the TITANIUM™ One-Step RT-PCR Kit (Clontech Laboratories, USA) from 1 µg of purified total RNA from total pancreas and islets. The PCR primers were designed from human somatostatin (forward: CCCCAGACTCCGTCAGTTTC, position 144-163; reverse: GCAGCCAGCTT-TGCGTTCTC, position 375-358) with a 231-bp cDNA fragment amplified. The PCR primers for the rat CCK_B receptor were (forward: CTTTCATCCCGGGTGTG-GTTATTGCG, position 725-749; reverse: CCCCAGTGTGCTGA TGGTGGTATAGC, position 1394-1369) with a 669 bp cDNA fragment amplified. For the human CCK_B receptor, sense and antisense primers were analogous to

nucleotides 732-756 and the complement to nucleotides 1112-1136. PCR primers for the human CCK_A receptor and the PCR amplification conditions are those described by Funakoshi [22]. PCR amplifications were performed under the following conditions: somatostatin: 60s 94°C, 45s 60°C, 45s 72°C (35 cycles); rat CCK_B receptor: 30s 94°C, 30s 57°C, 30s 72°C (35 cycles); human CCK_B receptor: 30s 94°C, 45s 58°C, 45s 68°C (35 cycles); CCK_A receptor: 45s 94°C, 45s 60°C, 45s 72°C (35 cycles). PCR samples were electrophorized on 1% agarose gel and DNA was visualized by ethidium bromide and photographed.

3.9 Immunohistochemistry and image analysis by confocal microscopy:

Human and rat pancreatic islets were plated on 20 mm glass coverslips pre-coated with 0.01% poly-L-Lysine (Sigma) and briefly rinsed in PBS. They were then fixed for 10 min at RT^o in 2% paraformaldehyde and saturated 10 min at RT^o in sodium borohydride, 2 mg ml⁻¹. After several rinses in PBS, islets were permeabilized for 30 min at RT^o in PBS, 0.4% Triton X-100, 7% normal donkey serum. After medium aspiration, islets were incubated in PBS, 0.4% Triton X-100, 1.4% normal donkey serum for 12h at 4°C with the primary antibodies: CCK_BR 9262 (1:1000); CCK_AR 1122 (1:200); somatostatin Barbar, a gift from Dr Brazeau, Université de Montréal, Montréal, Canada (1:50, 1 mg ml⁻¹); insulin 2D11-H5 from Santa Cruz, CA (1:50) and glucagon monoclonal clone K79bB10 from Sigma, St-Louis, MO (1:500). Specificity of each of these antibodies was established from preincubation of peptides and hormones at 40 µg ml⁻¹ for 2h at RT^o (15, 18). Subsequently, islets were incubated with the secondary antibodies (fluorochrome conjugated FITC 2 µg ml⁻¹ and rhodamine 4 µg ml⁻¹) (Molecular Probes Inc., Eugene, OR) in PBS, 0.4% Triton

X-100, 1.4% normal donkey serum for 1h at RT. The immunostained islets were examined with an Olympus Fluoview Confocal Scanning System (Olympus America Inc., N.Y.) mounted on an Olympus IX-70 microscope. The FITC and rhodamine fluophores were imaged using a 488 nm excitation and a green bandpass emission filter (i.e., 510-550 nm) and a 568 nm excitation and a red bandpass emission filter (i.e., 585-610 nm), respectively.

3.10 Insulin and somatostatin secretion from rat islets:

This study was undertaken to demonstrate rat islets survival in the course of purification and their responsiveness to stimulation. Insulin and somatostatin secretions were performed on groups of 100 islets for 2h at 37°C in Eppendorf tubes. Briefly, islets were washed 3 times in Hepes-buffered Krebs salt solution (115 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 24 mM NaHCO₃, 2.5 mM CaCl₂, 20 mM HEPES, pH 7.4, 5.5 mM glucose, 0.1% BSA, 100 µM DFP, 20 µM leupeptin, 1µM aprotinin, 2 µM pepstatin). The islets were incubated in 70 µl of the gassed (5% CO₂/95% O₂) incubation medium with the selected stimuli. At the end of the incubation period, the medium was removed and frozen at -80°C; the islets were extracted and boiled in 300 µl CH₃COOH, 2N. Acid was evaporated in a vacuum concentrator and samples were stored at -80°C until assayed. Before the assay, the acid extract was diluted in the assay buffer, sonicated for 15 sec and assayed. Somatostatin and insulin immunoreactivities were determined by ELISA. The somatostatin kit came from Peninsula Laboratories, San Carlos, CA and the insulin from Crystalchem Inc., Chicago, IL. Both kits have a sensitivity of 9.5 pg ml⁻¹. Somatostatin and insulin

releases are expressed as % of total islet contents and represent means \pm SE of 5 samples of 100 islets per group.

1. RESULTS

1.1 Evaluation of CCK receptor mRNAs by RT-PCR

With the RT-PCR technique, the CCK_AR mRNAs expression presents two transcripts in adult and fetal human purified islets as well as in rat islets and whole pancreatic gland (Fig. 1A, CCK_AR).

The same sensitive technique indicates that mRNAs isolated from adult and fetal human and rat purified islets and rat total pancreatic gland also exhibit one transcript of the CCK_BR (Fig. 1A, CCK_BR). In both species, levels of the CCK_BR mRNAs are much less abundant than those of the CCK_AR.

The somatostatin mRNAs present in adult and fetal human islets and in rat islets and total gland are equally expressed as indicated in Fig. 1A, SS.

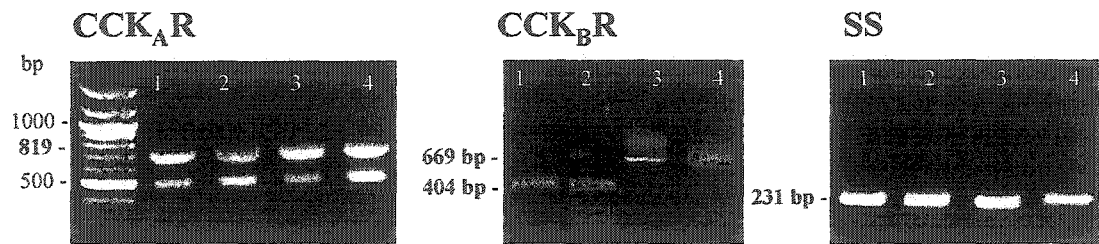
1.2 Evaluation of CCK receptor proteins by Western blot

As illustrated in Fig. 1B, CCK_AR, the human adult and fetal purified islets express a 50 kDa CCK_A receptor protein which is more abundant by 1.5 fold in adult than in fetal islets; this receptor is also present in total pancreas homogenate and purified membranes with higher level of expression in adult than fetal. The adult rat pancreatic islets also bear this CCK_AR as an 80 kDa protein similar to that present in

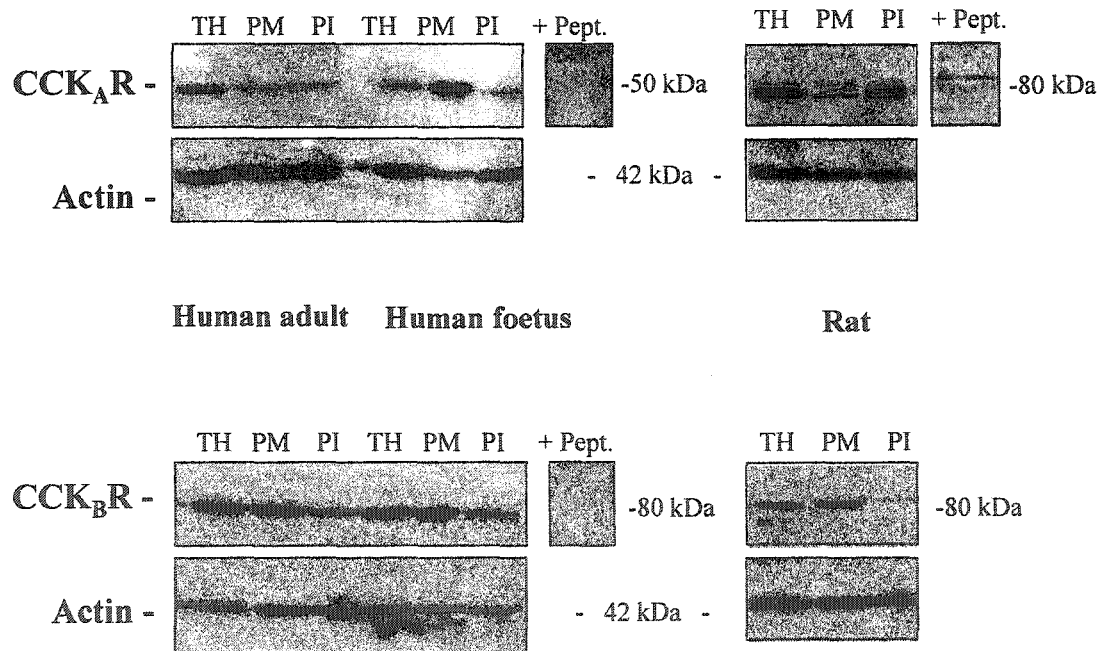
Figure 1A. RT-PCR amplification of CCK_A, CCK_B receptors and somatostatin (SS) mRNAs from total RNAs prepared from adult and fetal human purified islets, adult rat purified islets and whole pancreas. RNA was prepared and RT-PCR was performed as described in Materials and Methods. The results are representative of two experiments performed on pools of six rats. 1: adult human islets; 2: fetal human islets; 3: rat purified islets; 4: rat pancreas total homogenate.

Figure 1B. Presence of the CCK_A and CCK_B receptors proteins in adult and fetal human and adult rat total pancreatic homogenates (TH), purified membranes (PM) and purified islets (PI) evaluated by Western blot. For the human samples, the CCK_AR antibody 1122 was used at 1:1000 and antibody AR6 (1: 1000) was used for the rat samples. For human and rat samples, the CCK_BR antibody 9262 was used at 1:10,000. Conditions of the incubations are described in Materials and Methods. Specificity was established by preincubation of each primary antibody for 2h at RT^o with 40 µg ml⁻¹ of the corresponding peptide antigen (+ Pept). TH: total homogenate; PM: purified membrane; PI: purified islets. Ratios of CCK_A and CCK_B receptor proteins to actin were established from scanning and densitometry analysis.

A- RT-PCR



B- Western Blot



fractions of total homogenate and purified membranes. The rat islets express the CCK_AR protein 3.3 fold and 75% more than human fetal and adult islets, respectively. Specificity of the selected AR6 and 1122 antibodies was confirmed by their pre-absorption with excess peptide antigen (+ Pept).

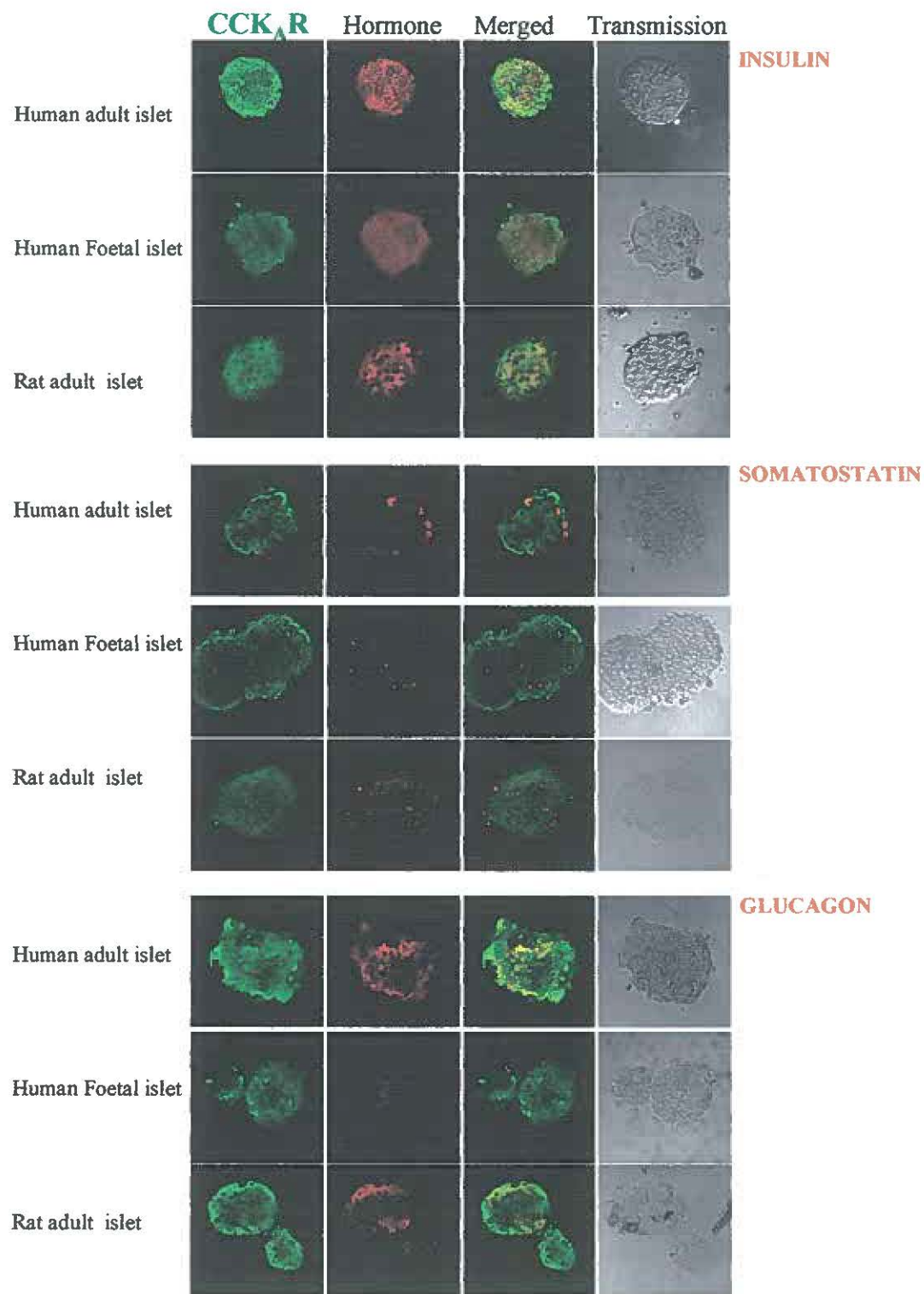
As shown in Fig. 1B, CCK_BR, the adult and fetal human and rat adult purified islets as well as homogenates from total gland and purified membranes express a similar 80 kDa CCK_B receptor protein. The relative abundance of this receptor is more important in human and fetal islets than in rat islets by around 50%. Specificity of the 9262 antibody was also established after its preincubation with its peptide antigen (+Pept).

1.3 Islet's cellular localization of the CCK receptors

As illustrated in Fig. 2, the CCK_AR is widely distributed in all purified islets from adult and fetal human pancreas as well as from rat pancreas. Similarly, these islets from human and rat pancreas contain large amounts of insulin with the human fetal islets poorer in insulin than those from adult human and rat. Somatostatin is also present in all human and rat islets and its concentration seems comparable in both species. Glucagon is also stored in islets of both species; it is evident that islets from adult human and rat contain more glucagon than those of the human fetus.

One of the important feature of this study remains the colocalization of the CCK_AR protein with some of the islets' hormones, established by confocal microscopy. On top, Fig. 2 clearly indicates that the insulin beta cells from human and rat islets contain the CCK_AR as indicated by the yellow color present on the three

Figure 2. Colocalization of the pancreatic CCK_A receptor with three islets hormones. Adult and fetal human and adult rat purified islets were incubated overnight at 4°C with the CCK_AR antibody 1122 (1:200), insulin (1:50), glucagon (1:500) and somatostatin (10 µg ml⁻¹) antibodies. Colocalization was established by confocal microscopy as described in Materials and Method. Magnification: 80x.



merged images. In the bottom of Fig. 2, we can also appreciate the colocalization of the CCK_AR proteins and glucagon in the alpha cells of human and rat islets. The images presented in the middle of Fig. 2 indicate that the somatostatin delta cells present in fetal and adult human and rat islets do not possess this CCK_AR protein as shown by the absence of yellow color in the merged pictures.

Images presented in Fig. 3 (top and bottom) show that the CCK_BR proteins do not colocalize with insulin and glucagon in cells of adult and fetal human islets and adult rat islets. On the contrary, the somatostatin delta cells of both species express the CCK_BR protein as indicated by the yellow color on the merged images in the middle section. We have previously established the specificity of the three hormones antibodies used [15] as well as those selected for CCK_A and CCK_BR proteins [18] by preincubating each antibody with either its specific hormone or the peptides used to develop the receptor antibody.

1.4 Islets responsiveness to secretagogues

The secretory capacity of the rat purified islets has been evaluated by measuring their insulin and somatostatin responses to appropriate stimuli. As shown in Fig. 4, the islets responded as expected to a 16 mM glucose challenge with a five fold increase in insulin release. The sensitivity of the pancreatic delta cells to various stimuli is however much less impressive. Indeed, somatostatin release in response to two adenylate cyclase activator agents, forskolin and IBMX, reached 1.3 and 1.7 fold above basal, respectively. However, to our great surprise, the delta cells did not

Figure 3: Colocalization of the pancreatic CCK_B receptor with three islets hormones. Adult and fetal human and adult rat purified islets were incubated overnight at 4°C with the CCK_BR antibody 9262 (1:1000) and with the antibodies raised against the three islets hormones described in Fig. 2. Colocalization was established as described in Fig. 2. Magnification: 80x.

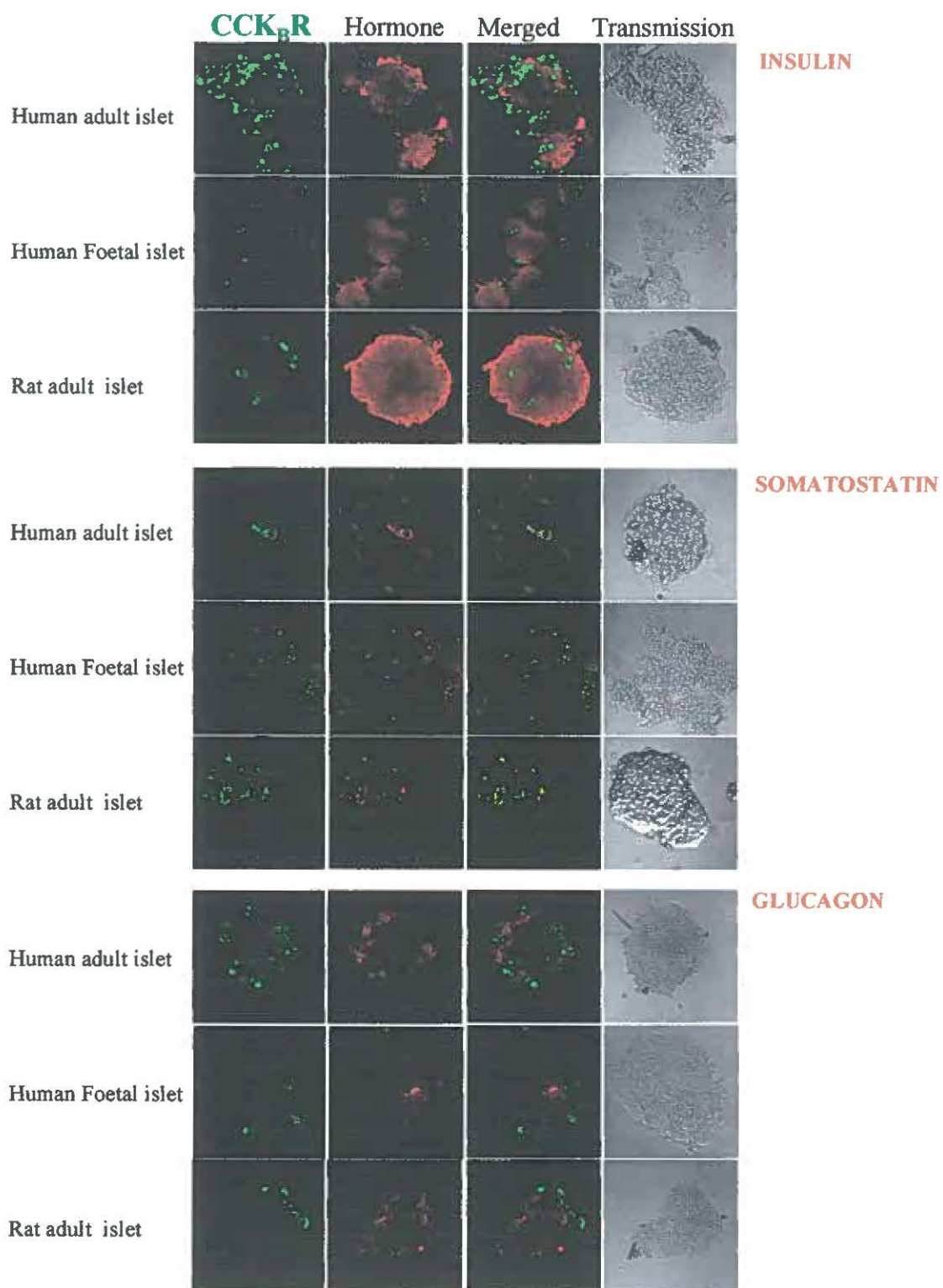
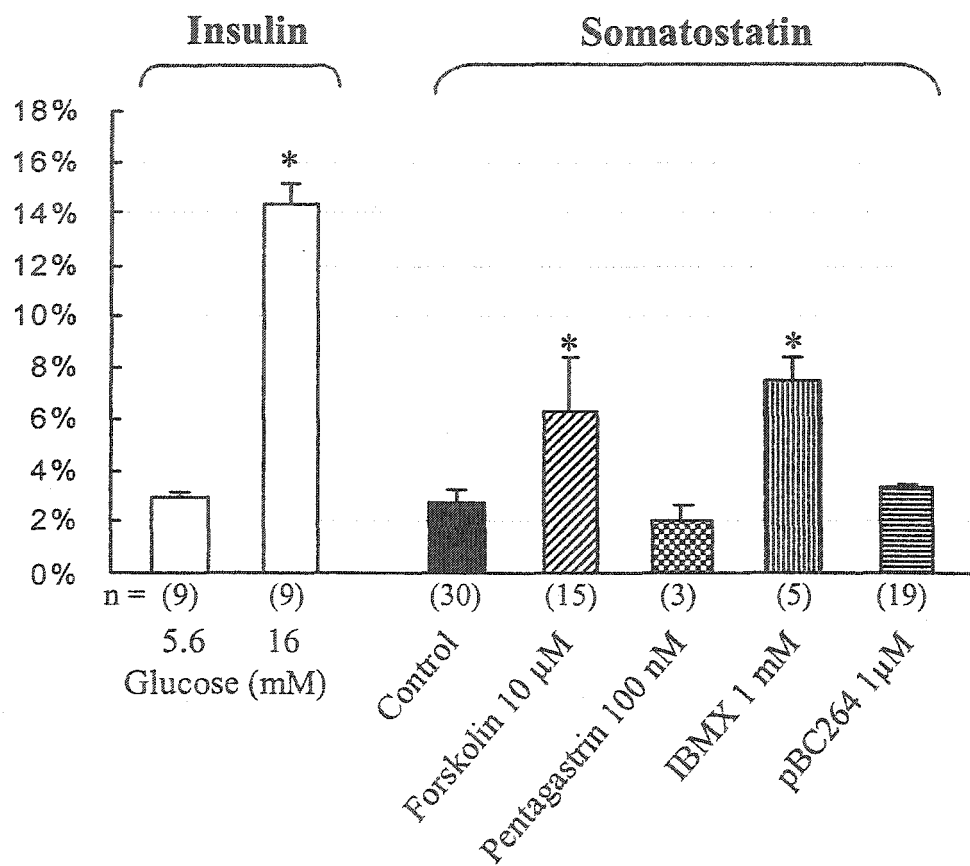


Figure 4. Islets' responses to secretagogues. Adult rat pancreatic islets were stimulated to secrete insulin and somatostatin for 2 hrs as described in Material and Methods. Numbers in () represent samples of 100 islets. Results are means \pm SE; *: significantly different from control values at $p < .05$.



respond to two known CCK_B receptor agonists, gastrin and pBC264 [23], as both agents failed to induce somatostatin release.

5. DISCUSSION

This study was designed to demonstrate that the rat purified pancreatic islets can be used as a useful tool to study some aspects of human islet physiology related to CCK receptors' occupation. Our data clearly indicate for the first time that 1) islets purified from fetal and adult human and rat pancreas express identical transcripts of CCK_AR mRNAs; 2) the fetal and adult human islets also exhibit a single CCK_BR mRNA transcript as in rat islets; 3) the somatostatin mRNAs are identically expressed in islets of both species; 4) the islets from fetal and adult human pancreas synthesize a 50 kDa CCK_AR protein different in size from the 80 kDa protein present in rat islets; 5) both species' islets express an 80 kDa CCK_BR protein; 6) in fetal and adult islets from human and rat, the CCK_AR colocalized with insulin and glucagon cells and the CCK_BR with the somatostatin cells. Finally, the rat purified islets are functional as they can release insulin and somatostatin.

Although the CCK_AR mRNAs were never observed in fetal nor adult human pancreas by Northern blot analysis [4, 5, 24], our data described the presence of two transcripts established by RT-PCR in human and rat islets as previously observed in human gall bladder [28] and pancreas [5]. With this same technique, others observed a single transcript [4, 9, 25] or were unable to detect any [26] in human, rat [4, 22, 24] and mouse [29] pancreas or rat islets [4]. A truncated CCK_A receptor has previously been described by photoaffinity [30]. The two transcripts observed in this study were

obtained whether Funakoski [22] or Schmitz [27] primers were used. We believe that a shorter time of migration on the agarose gel may explain these differences.

Our data obtained by RT-PCR confirm the previously observed presence of the CCK_BR mRNAs in human [4, 9] and rat [8, 14] pancreas as single transcripts [13, 14, 31]. To our knowledge, this is the first demonstration of SS mRNA expression in human purified islets, in agreement with the peptide present in 8 week fetal pancreas [32] and the single transcript [33].

The different molecular weights observed for the human and rat CCK_A receptor proteins were previously observed and may depend on antibody selection or various glycosylated forms of the receptor between species; these 50 and 80 kDa forms were previously described for the human [11] and rat [18] receptor. The same explanation stands for the molecular weight of the CCK_B receptor. Indeed, we report herein an 80 kDa protein in human and rat pancreas with antibody 9262; however, receptor proteins of 52 kDa were reported in fetal and human pancreas with antibody 9252 from CURE [34] and of 115 kDa in human fetal pancreas with antibody 9413 also from CURE [8].

Our present data strongly support the presence of CCK receptors on purified human and rat islets and indicate more specifically that the CCK_AR subtype is indeed present on insulin and glucagon cells as previously demonstrated by binding studies [35, 37]. These findings support a role for CCK on insulin and glucagon secretion [35, 36]. This colocalization of the CCK_AR with insulin and glucagon agrees with earlier observations in the rat, human and pig [11, 12] but does not support an earlier colocalization of glucagon with the CCK_BR in human [13] and rat [14] islets.

The release of somatostatin in response to CCK has been previously observed from an isolated perfused pancreatiko-duodenal canine preparation [38]; furthermore, CCK₈ also enhanced the effect of glucose on somatostatin release from freshly isolated rat islets [39]. Our present data confirm unequivocally the colocalization of the pancreatic CCK_BR and somatostatin in human adult and fetal purified islets and rat islets as previously observed [8, 34]. We were however unable to reproduce recent data demonstrating the presence of pancreatic CCK_BR on human [13] and rat [14] glucagon cells. Such discrepancies may result from the lack of specificity of other CCK_BR antibodies used or from the selection of tissue fixation. We cannot however play the card of species difference since we recently demonstrated that the CCK_BR antibody 9262 identified the somatostatin delta cells in human, pig, calf, horse, mouse and rat pancreas [18].

Previous studies on the role of CCK or gastrin on somatostatin secretion point to the occupation of the CCK_B receptor although this was never confirmed with specific CCK_B receptor antagonists. Indeed, from an isolated perfused porcine pancreas, somatostatin release was stimulated most efficiently by the CCK agonists CCK₄ and CCK₅ at concentrations of 10 nM and 1 μ M [40]. The observation that the insulino and glucagonotropic effects of CCK-8 significantly surpassed those of CCK-4, whereas the two peptides were equipotent in releasing somatostatin in a perfused dog pancreas, supports CCK_BR occupation [41]. Studies however on somatostatin release from isolated pancreatic islets are scattered [39, 42]. Our data on somatostatin secretion in response to forskolin and IBMX, a phosphodiesterase inhibitor, are comparable to those of Patel obtained from rat purified islets [42] or cultures of

neonatal rat pancreas [43]. However, our failure to observe any secretory response following pentagastrin and the CCK_B receptor agonist pBC264 differs from positive responses to CCK-8 at concentrations of 1 nM to 100 nM. Those responses however were in the order of 35 to 43% above basal, thus very weak [39]. Our data are rather comparable to those from isolated human antral D cells with a good secretory response to forskolin and a lack of somatostatin release following gastrin-17 at concentrations up to 1 μ M [44]. These negative results on somatostatin release from isolated islets may result from somatostatin inhibiting its own secretion or from the presence of a somatostatin inhibitor. Indeed, exogenous somatostatin can inhibit its endogenous release from isolated canine fundic D cells [45]. Finally, arginine-stimulated somatostatin release from rat pancreatic islets was potentiated by the addition of an antiserum raised against the islet amyloid polypeptide [46], a known endogenous inhibitor of islet's hormones release [47].

In conclusion, our data strongly indicate that the rat isolated pancreatic islets can be used as a human model to study the secretion and synthesis of the islet's hormones in response to the gastrin/cholecystokinin hormones family as islets of both species possess the same CCK receptor subtypes A and B with regards to mRNA and protein with the exception of 80 kDa instead of 50 kDa in human islets. Finally, the rat purified islets represent the best experimental tool to investigate the poor secretory responses of the delta cells to hormonal stimulation.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Mrs Christiane Gauvin for secretarial assistance, Dr Abou Elela and Mr Mathieu Catala for use of their confocal microscope. We also thank Professor Bernard P. Roques from the Université René Descartes (Paris V) for his supply of pBC264. This research was supported by grant GP6369 from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada.

REFERENCES

- [1] Wank SA, Harkins R, Jensen RT, Shapira H, deWeerth A, Shattery T. 1992 Purification, molecular cloning, and functioning expression of the cholecystokinin receptor from rat pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 3125-3129.
- [2] Lee Y-M, Beinborn M, McBride EW, Lu M, Kolakowski LF, Kopin AS. 1993 The human brain cholecystokinin-B/gastrin receptor: cloning and characterization. *J Biol Chem* 268: 8164-8169.
- [3] Lay JM, Jenkins C, Friis-Hansen L, Samuelson LC. 2000 Structure and developmental expression of the mouse CCK-B receptor gene. *Biochim Biophys Res Commun* 272: 837-842.
- [4] Monstein HJ, Nylander AG, Salehi A, Chen D, Lundquist I, Hakanson R. 1996 Cholecystokinin-A and cholecystokinin-B/gastrin receptor mRNA expression in the gastrointestinal tract and pancreas of the rat and man. *Scand J Gastroenterol* 31: 383-390.
- [5] Funakoshi A, Fukamizu Y, Miyasaka K. 1999 Mechanism of cholecystokinin-A receptor antagonist on human pancreatic exocrine secretion. *Digestion* 60: 75-80.
- [6] Wank SA, Pisegna JR, deWeerth A. 1992 Brain and gastrointestinal cholecystokinin receptor family: structure and functional expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8691-8695.

- [7] Zhou W, Povaski SP, Bell RH. 1995 Characterization of cholecystokinin receptors and messenger RNA expression in rat pancreas: evidence for expression of cholecystokinin-A receptors but not cholecystokinin-B (gastrin) receptors. *J Surg Res* 58: 281-289.
- [8] Morisset J, Wong H, Walsh JH, Lainé J, Bourassa J. 2000 Pancreatic CCK_B receptors: their potential roles in somatostatin release and δ cell proliferation. *Am J Physiol* 279: G148-G156.
- [9] Ji B, Bi Y, Simeone D, Mortensen RM, Logsdon GD. 2001 Human pancreatic acinar cells lack functional responses to cholecystokinin and gastrin. *Gastroenterology* 121: 1380-1390.
- [10] Pisegua JR, deWeerth A, Huppi K, Wank SA. 1992 Molecular cloning of the human brain and gastrin cholecystokinin receptor: structure, functional expression and chromosomal localization. *Biochim Biophys Res Commun* 189: 296-303.
- [11] Bourassa J, Lainé J, Kruse ML, Gagnon MC, Calvo E, Morisset J. 1999 Ontogeny and species differences in the pancreatic expression and localization of the CCK_A receptors. *Biochim Biophys Res Commun* 260: 820-828.
- [12] Schweiger M, Erhard MH, Amselgruber WM. 2000 Cell-specific localization of the cholecystokinin a receptor in the porcine pancreas. *Anat Histol Embryol* 29: 357-361.
- [13] Saillan-Barreau C, Dufresne M, Clerc P, Sanchez D, Corominola H, Moriscot C, Guy-Crotte O, Escrient C, Vagsse N, Comis R, Tarasova N, Fourmy D.

- 1999 Evidence for a functional role of the cholecystokinin-B/gastrin receptor in the human fetal and adult pancreas. *Diabetes* 48: 2015-2021.
- [14] Rooman I, Lardon J, Flamez D, Schuit F, Bouwens L. 2001 Mitogenic effect of gastrin and expression of gastrin receptors in duct-like cells of rat pancreas. *Gastroenterology* 121: 940-949.
- [15] Morisset J, Lainé J, Bourassa J, Lessard M, Romé V, Guilloteau P. 2003 Presence and localization of CCK receptor subtypes in calf pancreas. *Regul Peptides* 111: 103-109.
- [16] Morisset J, Bourassa J, Tessier P, Lessard M, Rome V, Guilloteau P, Merritt A, Lainé J. 2002 The pancreatic CCK_B receptor: the existing controversy about its cellular location among species. *Pancreatology* 2: 276.
- [17] Lacy PE, Kostianovsky M. 1967 Methods for the isolation of intact islets of Langerhans from rat pancreas. *Diabetes* 16: 35-39.
- [18] Morisset J, Julien S, Lainé J. 2003. Localization of cholecystokinin receptor subtypes in the endocrine pancreas. *J. Histochem Cytochem.* 51: 1501-1513.
- [19] Petropavlovskaja M, Rosenberg L. 2002 Identification and characterization of small cells in the adult pancreas: potential progenitor cells? *Cell Tissue Res* 310: 51-58.
- [20] Chomczynski P, Sacchi N. 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159.

- [21] Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. 1979 Isolation and biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18: 5294-5299.
- [22] Funakoshi A, Miyasaka K, Shinozaki H, Masuda M, Kawanami T, Takata Y, Kono A. 1995 An animal model of congenital defect of gene expression of cholecystokinin (CCK)-A receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 210: 787-796.
- [23] Noble F, Roques BP. 1999 CCK-B receptor: chemistry, molecular biology, biochemistry and pharmacology. *Prog Neurobiol* 58: 349-379.
- [24] Wank SA. 1995 Cholecystokinin receptors. *Am J Physiol* 269: G 628-G646.
- [25] Goetze JP, Nielsen FC, Burcharth F, Rehfeld JF. 2000 Closing the gastrin loop in pancreatic carcinoma: Coexpression of gastrin and its receptor in solid human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 88: 2487-2494.
- [26] Weinberg DS, Chi S, Ruggeri B, Biswas S, Barber M, Waldman S. 2000 Human cholecystokinin-A receptor is not an oncofetal protein. *Dig Dis Sci* 45: 538-543.
- [27] Schmitz F, Schrader H, Otte JM, Schmitz H, Stuber E, Herzig KH, Schmidt WE. 2001 Identification of CCK-B/gastrin receptor splice variants in human peripheral blood mononuclear cells. *Regul Peptides* 101: 25-33.
- [28] Miller LJ, Holicky EL, Ulrich CD, Wieben ED. 1995 Abnormal processing of the human cholecystokinin receptor gene in association with gallstones and obesity. *Gastroenterology* 109: 1375-1380.

- [29] Lacourse KA, Lay JM, Swanberg LJ, Jenkins C, Samuelson LC. 1997 Molecular structure of the mouse CCK-A receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 236: 630-635.
- [30] Silvente Poirot S, Escrieut C, Dufresne M, Martinez J, Bouisson M, Vaysse N, Fourmy D. 1994 Photoaffinity labeling of rat pancreatic cholecystokinin type A receptor antagonist binding sites demonstrates the presence of a truncated cholecystokinin type A receptor. *Molec Pharmacol* 45: 599-607.
- [31] Clerc P, Leung-Theung-Long S, Wang TC, Dockray G, Bouisson M, Delisle MB, Vaysse N, Pradayrol L, Fourmy D, Dufresne M. 2002 Expression of CCK2 receptors in the murine pancreas: proliferation, transdifferentiation of acinar cells, and neoplasia *Gastroenterology* 122: 428-437.
- [32] Chayvialle JA, Paulin C, Dubois PM, Descos F, Dubois MP. 1980 Ontogeny of somatostatin in the human gastrointestinal tract, endocrine pancreas and hypothalamus. *Acta Endocrinol* 94: 1-10.
- [33] Montminy MR, Goodman RH, Horovitch SJ, Habener JF. 1984 Primary structure of the gene encoding rat preprosomatostatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 3337-3340.
- [34] Julien S, Lainé J, Morisset J. 2002 Expectation of pancreatic physiological responses from CCK_B receptor occupation in its natural environment. In: *Gut Brain Peptides in the New Millennium: A Tribute to John Walsh by his collaborators*. Ed Taché Y, Goto Y, Ohning G, Yamada T. CURE Foundation, Los Angeles, Ca p 425-436.

- [35] Verspohl EJ, Hafner B, He X, Knittel JJ. 1994 Evidence for cholecystokinin receptor subtype in endocrine pancreas. *Peptides* 15: 1353-1360.
- [36] Zawulich WS, Cote SB, Diaz VA. 1986 Influence of cholecystokinin on insulin output from isolated perfused pancreatic islets. *Endocrinology* 119: 616-621.
- [37] Verspohl EJ, Ammon HPT, Williams JA, Goldfine ID. 1986 Evidence that cholecystokinin interacts with specific receptors and regulates insulin release in isolated rat islets of Langerhans. *Diabetes* 35: 38-43.
- [38] Hermansen K. 1980 Effects of substance P and other peptides on the release of somatostatin, insulin and glucagon *in vitro*. *Endocrinology* 107: 256-261.
- [39] Verspohl EJ, Ammon HPT. 1987 Cholecystokinin (CCK8) regulates glucagon, insulin and somatostatin secretion from isolated rat pancreatic islets: interaction with glucose. *Pflugers Arch* 410: 284-287.
- [40] Rehfeld JF, Larsson LI, Goltermann NR, Schwartz TW, Holst JJ, Jensen SL, Morley JS. 1980 Neural regulation of pancreatic hormone secretion by the C-terminal tetrapeptide of CCK. *Nature* 284: 33-38.
- [41] Hermansen K, 1984 Effects of cholecystokinin (CCK)-4, nonsulfated CCK-8, and sulfated CCK-8 on pancreatic somatostatin, insulin, and glucagon secretion in the dog: studies *in vitro*. *Endocrinol* 114: 1770-1775.
- [42] Patel YC, Papachristou DN, Zingg HH, Farkas EM. 1991 Regulation of islet somatostatin secretion and gene expression: selective effects of adenosine 3',5'-monophosphate and phorbol esters in normal islets of Langerhans and in a

- somatostatin-producing rat islet clonal cell line 1027B2. *Endocrinol* 128: 1754-1761.
- [43] Patel YC, Amherd TM, Orci L. 1979 Somatostatin secretion from monolayer cultures of neonatal rat pancreas. *Endocrinol* 104: 676-679.
- [44] Buchan AMJ, Curtis SB, Meloche RM. 1990 Release of somatostatin immunoreactivity from human antral D cells in culture. *Gastroenterology* 99: 690-696.
- [45] Park J, Chiba T, Yokotani K, Delvalle J, Yamada T. 1989 Somatostatin receptors on canine fundic D-cells: evidence for autocrine regulation of gastric somatostatin. *Amer J Physiol* 257: G235-G241.
- [46] Wang F, Adrian TE, Westermark GT, Ding X, Gasslander T, Permet J. 1999 Islet amyloid polypeptide totally inhibits β , α , and δ -cell secretion in isolated rat pancreatic islets. *Am J Physiol* 276: E19-E24.
- [47] Silvestre RA, Salas M, Rodriquez-Callardo J, Garcia-Hermida O, Fontela T, Marco J. 1996 Effect of (8-32) salmon calcitonin, an amylin antagonist, on insulin, glucagon and somatostatin release: study in the perfused pancreas of the rat. *Br J Pharmacol* 117: 347-350.

II- MATERIEL ET METHODES/ III- RÉSULTATS

Article 3: Sophie Julien, Jean Laine and Jean Morisset. Regulation of rat pancreatic CCK_B receptor and somatostatin expression by insulin. Diabetes 53: 2004 (Sous presse).

**REGULATION OF RAT PANCREATIC CCK_B RECEPTOR AND
SOMATOSTATIN EXPRESSION BY INSULIN**

Short title : Diabetes and CCK_BR and SS expression

Sophie JULIEN, Jean LAINE and Jean MORISSET

Gastroenterology Service, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Université
de Sherbrooke, Sherbrooke, Qc, Canada, J1H 5N4.

Tel : (819) 820-6813 Fax : (819) 820-6826

Email : jean.morisset@Usherbrooke.ca

ABSTRACT

The cholecystokinin B receptor (CCK_BR) is localized on pancreatic endocrine somatostatin (SS) delta cells. Pancreatic SS contents were increased in diabetic rats. The mechanisms involved in this phenomenon are unknown and we believe insulin is involved. In this study, four groups of rats were used : controls, streptozotocin-diabetic, streptozotocin-diabetic with insulin and streptozotocin-diabetic-insulin and its cessation. Rats were sacrificed after 7 to 28 days of treatment for diabetes, SS mRNA expression and pancreatic SS contents, CCK_BR mRNA and protein expression evaluation in total pancreas and purified islets and islets'cellular localization of SS and CCK_BR. Data indicate that diabetes is established after 7 days, is controled by insulin and reappeared after treatment cessation. Pancreatic SS mRNA expression and SS contents increased during diabetes, normalized during insulin treatment and reaugmented after its cessation. Gland and islets CCK_BR mRNA and protein almost disappeared during diabetes; CCK_B mRNA reappeared in response to insulin but not the protein. Confocal microscopy confirmed data obtained on SS and CCK_BR established biochemically in the course of treatments. In conclusion, these data strongly suggest that insulin can negatively control pancreatic SS mRNA and hormone content and positively CCK_BR mRNA; the CCK_BR protein seems delayed.

INTRODUCTION

During the seventies, major changes were observed in the metabolism of pancreatic somatostatin during diabetes development in human and experimental animals; these modifications included increased secretion, tissue contents and delta cells population (1-12). On the contrary, it was also reported that in diabetic mice mutant, ob/ob and db/db, pancreatic somatostatin contents were decreased along with reduction in islets' somatostatin cells (13-14). It was later suggested that in streptozotocin-diabetic rats, regulation of somatostatin gene transcription was targeted to the pancreas and stomach but not to the other somatostatin-producing tissues (15).

The role played by insulin on somatostatin release remains controversial. Indeed, insulin can stimulate somatostatin release from perfused chicken pancreas-duodenum (16); however, data from monolayer cultures of neonatal rat pancreas (17) and isolated dog pancreas (18) clearly showed that insulin failed to induce somatostatin release. In anesthetized normal and diabetic dogs, insulin infusion or injection was associated with an immediate reduction of the venous pancreaticoduodenal release of somatostatin (19). All these differences could be explained by the different models used to study somatostatin release.

Cholecystokinin (CCK), a duodenal hormone released into the bloodstream after meal ingestion, is recognized as the major hormonal factor involved in the regulation of pancreatic exocrine secretion, gall-bladder contraction, gastric emptying and small bowel motility. CCK is also involved in regulation of the endocrine pancreas; indeed, it can stimulate insulin secretion from an in vitro rat perfused pancreas (20) and in

vivo in the rat (21), pig (22), mouse (23) and human (24). In human, the insulinotropic effect of CCK was attenuated by the specific CCK-A receptor antagonist L-364,718 (25). Finally, it was recently observed that a defect in the CCK-A receptor gene of OLETF (Otsuka Long- Evans Tokushima Fatty) rats led to obesity and diabetes (26,27).

With regards to pancreatic somatostatin delta cells, we recently demonstrated that these cells specifically bear the CCK_B receptor as established by RT-PCR, Western blotting and confocal microscopy in rat, mouse, dog, pig, horse, calf and human (28,29). This new discovery may indicate that this CCK_B receptor could be involved in somatostatin metabolism and/or the control of the delta cells growth.

Therefore, knowing that diabetes causes modifications in the pancreatic delta cells metabolism and that these cells express the CCK_B receptor, this study has for objectives to characterize the changes in somatostatin mRNA expression and contents along with those of the CCK_B receptor in normal and diabetic rats and to determine if insulin treatment can normalize the modifications observed during diabetes development.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Animals experiments. Male Sprague Dawley rats, purchased from Charles River Laboratories, Inc.(St-Constant, Canada), were housed in a light and humidity controlled room and given free access to food and water.

After an overnight fast, rats (200-220 g) were rendered diabetic (Group STZ-D, n=160) by a single intraperitoneal injection of 65 mg/kg body weight streptozotocin (STZ) (Sigma) dissolved in 0.1 M citrate buffer, pH 4.5; controls received the same volume of citrate buffer alone (Nondiabetic, Group ND, n=40). Animals were used 7 (Group STZ-D7, n=20), 14 (Group STZ-D14, n=20), 21 (Group STZ-D21, n=20) or 28 days (Group STZ-D28, n=20) after diabetes induction. 7 days after STZ, 80 diabetic rats received twice daily subcutaneous injections of NgPE Insulin (Group STZ-I), (3U at 8:00 a.m., 5U at 8:00 p.m.) and were sacrificed 7 (Group STZ-I7, n=20), 14 (Group STZ-I14, n=20) or 21 days (Group STZ-I21, n=20) after the initial insulin injection. 20 other insulin treated rats were denied their insulin after 21 days and were killed 21 days later (Group STZ-I21/D21). Before euthanasia, all animals were fasted except Group I rats. Under anesthesia, blood was collected from the inferior vena cava and the pancreas was excised. Plasma was separated by centrifugation at 4°C and stored at -20°C for measurement of glucose and triglycerides. These studies were performed according to our institutional animal care policies.

Tissue preparations. Once excised, pancreas were quickly frozen in liquid nitrogen and kept frozen at -80°C until they were processed for receptor proteins analysis by western blot or for total pancreas RNA extraction to determine CCK receptor and somatostatin expression by RT-PCR.

Glycemia and lipidemia determinations. Plasma glucose and triglycerides were measured according to Vitros GLU slides and Vitros TRIG slides test methodology

(Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., NY, USA) respectively. Both analyses are based on enzymatic methods as described in (30, 31).

Rat islets isolation. Islets were purified from diabetic and control rats according to the modified method of Lacy and Kosianovsky (32) as recently described (33). Yield were approximatively 350-400 islets from each diabetic pancreas and around 650 to 800 islets from a normal pancreas.

RIN-14B cells. The RIN-14B cells were obtained from ATCC; these cells are a secondary clone derived from the RIN-m rat islet cell line (34) and they do not produce insulin. Cells were grown in RPMI 1640 medium according to ATCC specifications.

Somatostatin and amylase content determinations. Tissue samples were rapidly frozen in liquid nitrogen until used. For somatostatin determinations, a 10% homogenate was made in CH_3COOH 2N, boiled for 15 minutes and centrifuged 20 minutes at 12000 x g. The supernatants (3 ml) were extracted using Waters Sep-Pak C_{18} cartridges (Waters Associates, Milford, MA) pre-wetted with 100% acetonitrile followed by 0.05% TFA (15 ml). The cartridges were loaded with extract, washed with 0.05% TFA (15 ml) and eluted with 80% acetonitrile in 0.05% TFA (4 ml). The eluates were dried in a vacuum concentrator and stored at -80°C . Somatostatin immunoreactivity was determined by ELISA (Peninsula Laboratories, San Carlos, CA). Amylase activity was determined directly from homogenates according to the procedure described in (35) and the western blot was performed with an amylase antibody, a gift from G. Grondin, Dept Biologie, Université de Sherbrooke.

Membrane preparation, gel electrophoresis and immunoblotting. All procedures were carried out at 4°C. Freshly removed pancreas were minced and disrupted in a homogenization buffer (10 mM HEPES, pH 7.5, 250 mM sucrose, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 0.5 mM DFP, 20 µM Leupeptin, 1.5 µM Aprotinin) with the use of five passes through a Potter-Elvehjem homogenizer. Unbroken cells and nuclei were removed by centrifugation at 500g for 5 min. Membranes were collected by centrifugation at 100 000g for 1h using a Beckman TLS-55 rotor. The supernatants were removed and membranes were resuspended at a dilution of 15-30 mg/ml in the homogenization buffer and stored at – 80°C until used. A similar procedure was performed to prepare membranes from the RIN-14B cells. The procedures for gel electrophoresis and immunoblotting were performed as previously described (29) with the CCK_B receptor antibody 9262. The IGF-1 receptor antibody was a rabbit polyclonal from Santa Cruz, a gift from Dr M. Korc, Dartmouth Medical School, Lebanon, NH. It was used at a 1/1000 dilution.

Islets and pancreas total RNA extraction and RT-PCR. Total RNAs from rat purified islets were extracted by the method of Chomczynski and Sacchi (36). Total RNAs from rat pancreas were isolated according to a modification of the procedure of Chirwing et al. (37) as described (38). Total RNA concentration was determined by absorbance at 260 and 280 nm. RT-PCR was performed using the TITANIUM™ One-Step RT-PCR Kit (Clontech Laboratories, USA) from 500 ng of purified total RNA from total pancreas or purified islets. The PCR primers were designed from human somatostatin (forward, CCCAGACTCCGTCAGTTTC, position 144-163; reverse, GCAGCCAGCTTTG-CGTTCTC, position 375-358) with a 231 bp cDNA

fragment amplified. The PCR primers for the rat CCK_B receptor were (forward, CTTTCATCCCCGGGTGTGGTTA-TTGCG, position 725-749; reverse, CCCCAGTGTGCTGATG-GTGGTATAGC, position 1394-1369) with a 669 bp cDNA fragment amplified. PCR primers for the rat 18S were (forward: TCAAGAACGAAAGTCGGAGG, position 1038-1057; reverse, GGACATCTAAGGGCATCAC, position 1516-1498) with a 478 bp cDNA fragment amplified. Reverse transcription was performed 1h at 50°C and PCR amplifications were performed under the following conditions : SS: 60s 94°C, 45s 60°C, 45s 72°C (35 cycles); CCK_B receptor : 30s 94°C, 30s 57°C, 30s 72°C (35 cycles); 18S : 60s 94°C, 45s 47°C, 45s 72°C (30 cycles). PCR samples were electrophorized on a 1% agarose gel and DNA was visualized by ethidium bromide.

Immunocytochemistry and image analysis by confocal microscopy. These procedures were extensively described recently with regards to the antibodies used, their dilution and their specificity (29, 39.)

Statistical analysis. Results represent means \pm SEM. The statistical analysis was done using a Student's t-test (two tailed). A probability value of <0.05 was considered significant.

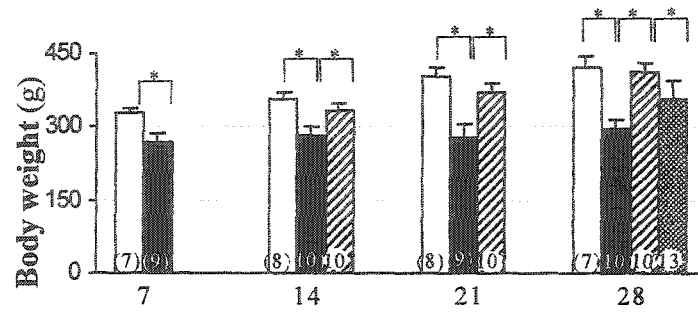
RESULTS

Body weight, plasma glucose and triglycerides and pancreatic amylase. As shown in Fig. 1A, body weights of the diabetic animals (STZ-D) exhibited significant early decreases of 18% at day 7, down to 29.6% at day 28 when compared to their

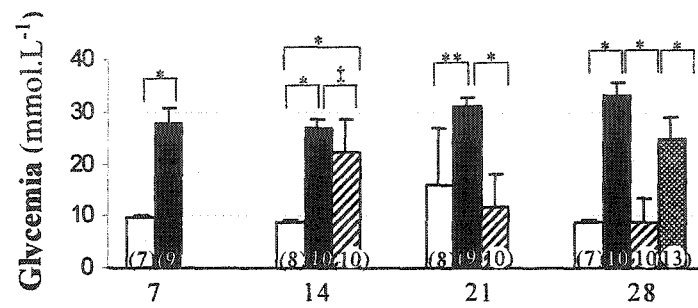
Figure 1. Effects of diabetes and insulin treatment on rat body weights, plasma glucose and triglycerides and pancreatic amylase contents. Control (ND), streptozotocin-diabetic (STZ-D), streptozotocin-diabetic with insulin (STZ-I) and streptozotocin-diabetic with insulin followed by cessation of insulin (STZ-I21/D21) rats were sacrificed at different times after the beginning of each treatment. Before sacrifice, they were weighted (A) and blood was withdrawn for glucose (B) and triglycerides (C) determinations; pancreatic amylase was also estimated after organ excision (D,E). Results represent means \pm SEM of the number of animals per group (), *, $P < 0.01$; **, $P < 0.001$; ‡, $P < 0.05$.

□ ND ▨ STZ-I21
 ■ STZ-D28 ▩ STZ-I21/D21

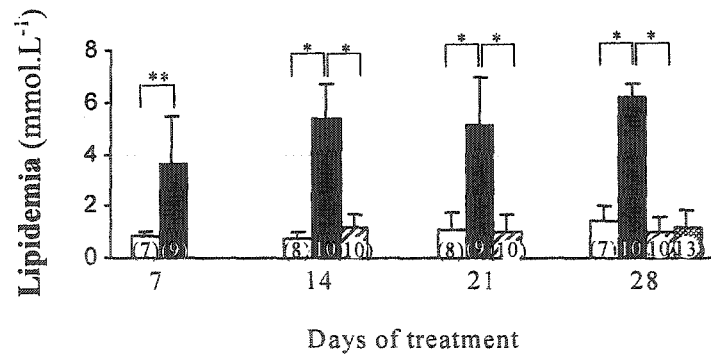
A



B

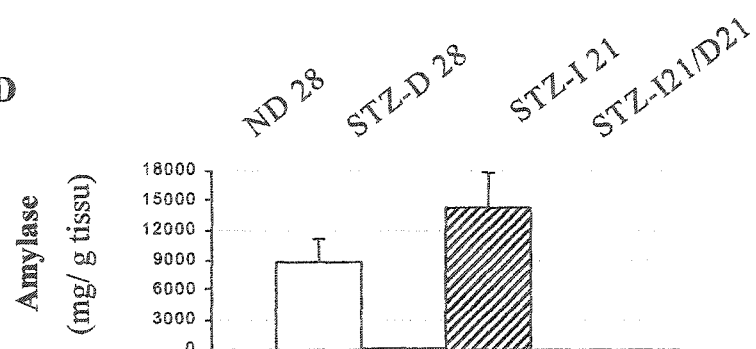


C



Days of treatment

D



E



respective controls. Treatment of the diabetic animals (STZ-I) with insulin immediately reversed the losses in body weight; a 15% increase was observed after 7 days up to 28.4% after three weeks, thus a return to control values. Cessation of

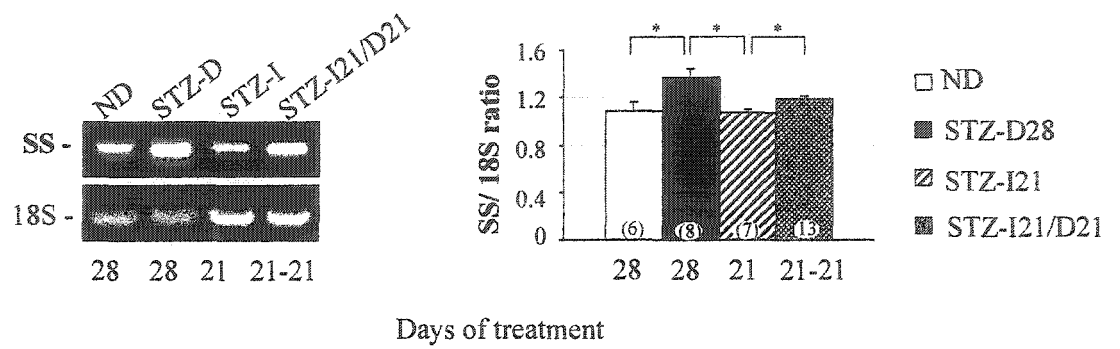
insulin for 21 days caused a new drop of 14.2% in body weight when group STZ-I21/D21 is compared to group STZ-I21.

The streptozotocin-diabetic rats (STZ-D) presented severe hyperglycemia after 7 days (+182%) up to 286% after 28 days when compared to their respective controls (Fig. 1B). Under insulin, a gradual recovery is observed and glycemia reached control values after 14 days (ND-28 vs STZ-I28). Cessation of insulin resulted in a significant 173% increase in glycemia after 21 days (STZ-I21 vs STZ-I21/D21). Diabetes was also assessed by measurements of plasma triglycerides. As shown in Fig. 1C, triglyceridemia was already increased by 332% 7 days after STZ; these large increases remained until day 28. Insulin restored plasma triglycerides back to control levels within one week. Contrary to glycemia which got back to high values after stopping the insulin treatment, triglycerides remained however at control values (STZ-I21/D21 vs ND28).

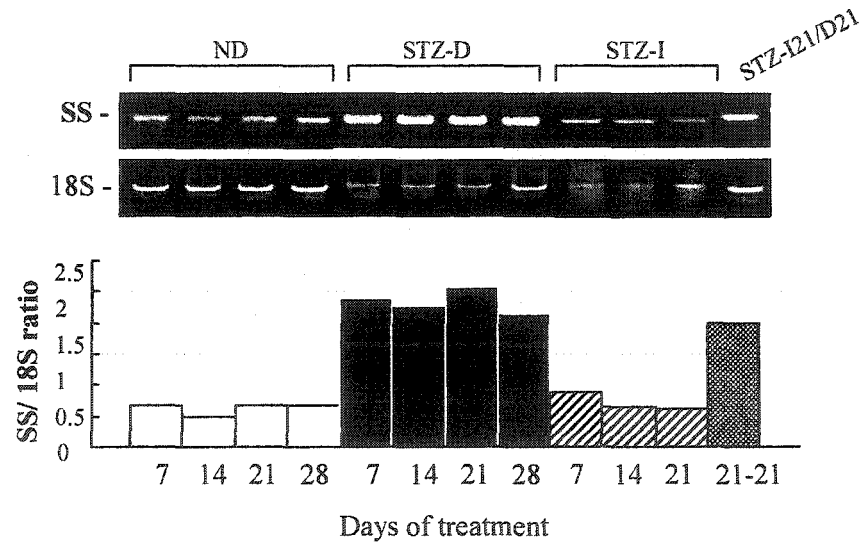
As previously observed (40), diabetes is also associated with a complete loss of pancreatic amylase activity (Fig. 1D) and content (Fig. 1E); a return to control values is observed after insulin and a new drop occurred upon cessation of the insulin treatment. It is important to notice that losses in activity also corresponded to losses in protein.

Figure 2. Effects of streptozotocin and insulin treatment on somatostatin mRNA expression and hormone contents. 500 ng of total RNA extracted from whole pancreas (A) and purified islets (B) were processed for RT-PCR analysis. The different groups are as described in the legend of Fig.1. In A, the histogram represents the number of animals per group in (). In B, values represent data from a pool of several rats' purified islets; the experiment was repeated twice. In C, data represent somatostatin pancreatic content of the different groups with the number of rats per groups (). Results are the means \pm SEM, *, $P < 0.01$ when compared to controls, () : number of cell samples per group.

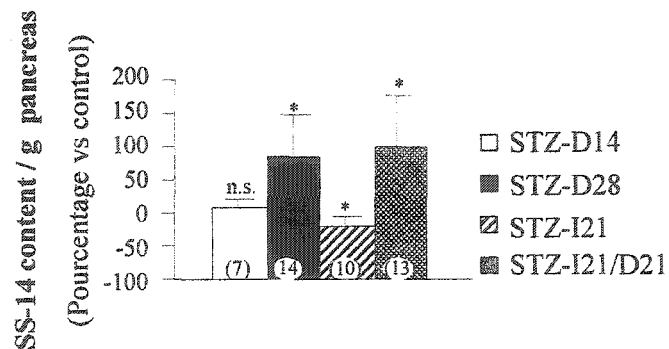
A- Total pancreas RNA



B- Purified islets RNA



C- SST content



Variations in pancreatic somatostatin mRNA and hormone content. As shown in Fig. 2A, somatostatin mRNA exhibited a significant increase of 23% over control values 28 days after diabetes induction (STZ-D vs ND) when RNA from total pancreas was used. Insulin given for 21 days returned SS mRNA to control values (STZ-I vs ND) whereas its cessation caused a new significant increase of 10% in SS mRNA (STZ-I21/D21 vs STZ-I21). Since pancreatic somatostatin is exclusively located in the islet's delta cells (28), we decided to verify if alterations of SS mRNA expression observed in whole pancreas were also present in RNA extracted from purified islets. RNAs were then extracted from pools of 5 to 7 islets' preparations as indicated in Fig. 2B. In control rats (ND), a constant expression of SS mRNA can be observed. Diabetes was associated with a 4 fold increment in SS mRNA already 7 days after its induction, an elevation which remained for 28 days. Insulin treatment caused a prompt return of SS mRNA to control values already after 7 days which remained throughout treatment. However, cessation of insulin resulted in a new increase in SS mRNA to levels comparable to those in the initial diabetic animals.

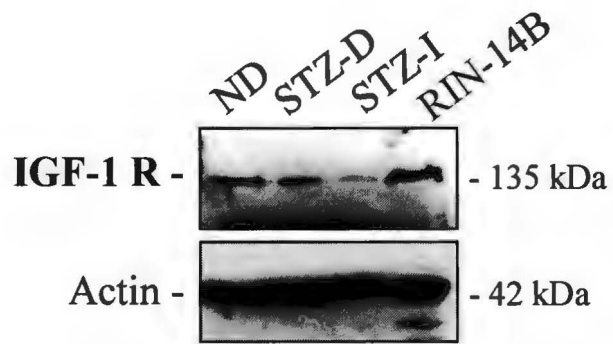
These variations in SS mRNA were accompanied by comparable changes in total pancreatic SS contents as shown in Fig. 2C. Indeed, although SS contents remained at control values after 14 days of diabetes (data not shown), a significant 97% increase was observed 14 days later. A 21 day insulin treatment resulted in a significant decrease of 36% in SS total contents below control values. Interestingly, cessation of this insulin treatment for a further 21 days resulted in a significant 140% increase in SS contents when compared to insulin treatment (STZ-I21/D21 vs STZ-I21) as observed for its mRNA.

Mode of insulin action : direct or indirect ? To answer this question, we first investigated the effects of diabetes and insulin treatment on IGF-1 receptor protein expression. Secondly, we determined the effects of insulin on somatostatin mRNA expression in RIN-14B cells. As shown in Fig 3A, the IGF-1 receptor proteins are expressed in control islets, in those of the diabetic rats and in islets of insulin-treated rats. However, 14 days of diabetes resulted in an important reduction in islet's IGF-1 receptor which seems accentuated by a 14 day insulin treatment. Of importance is the fact that the IGF-1 receptors are present on the remaining islet's cells and can thus still carry the insulin messages. The direct effect of insulin on somatostatin expression is unequivocally demonstrated by the observation that insulin can repress within 8h by 62 % somatostatin mRNA expression in RIN-14B cells which synthesize somatostatin (Fig.3B). These data clearly establish the direct inhibitory effect of insulin probably through the IGF-1 receptor also present on these cells as shown in Fig. 3A.

Variations in CCK_B receptor mRNA and protein. Since CCK_BR was previously shown to colocalize with somatostatin in pancreatic endocrine delta cells (29), we investigated the potential relationship that might exist between alterations in somatostatin expression and the behaviour of the CCK_BR in the course of diabetes development, during insulin treatment and after its cessation. As shown in Fig. 4A, expression of the CCK_BR mRNA evaluated from total pancreas RNA was dramatically and significantly reduced by 72% after 28 days of diabetes when compared to controls (STZ-D vs ND). By contrast, insulin given for 21 days enhanced significantly CCK_BR mRNA by 60% when compared to diabetic animals

Figure 3. A- IGF-1 receptor protein expression was analyzed by Western Blot from purified normal rat islet (ND), 14 days diabetic rats (STZ-D), 5 days diabetic rats treated 14 days with insulin (STZ-I) and from somatostatin RIN-14B cells. B- Effects of insulin on somatostatin mRNA expression in RIN-14B cells. Cells were treated with 100 nM insulin for 8 hours (I) or not (C) . Results are the means \pm SEM, *, $P < 0.01$ when compared to controls.

A- IGF-1 receptor protein expression



B- RIN-14B RNA

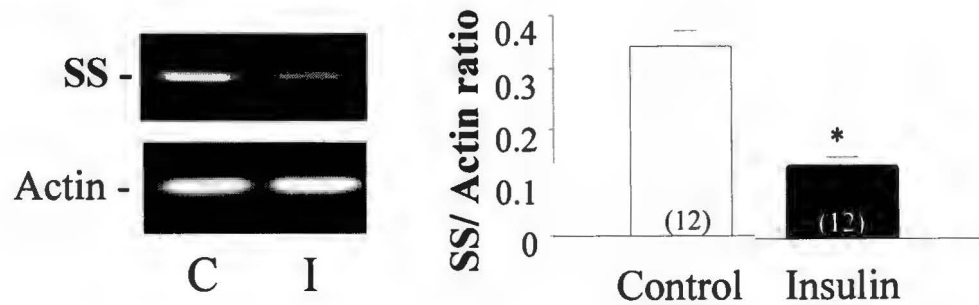
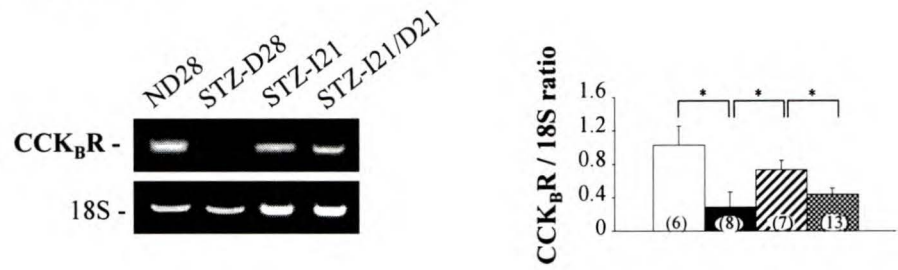
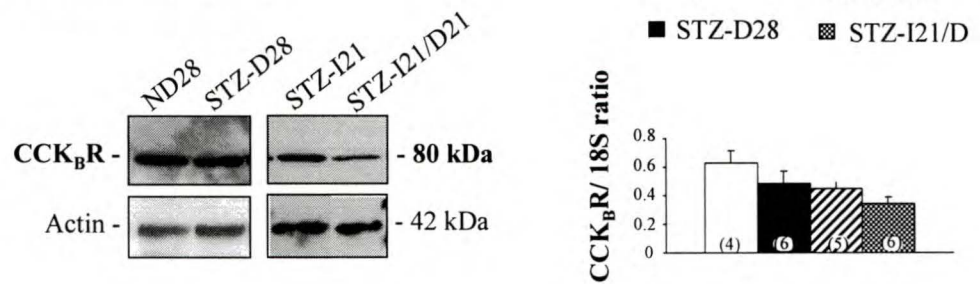


Figure 4. Effects of diabetes insulin treatment on CCK_BR mRNA and protein. 500 ng of total RNA extracted from whole pancreas (A) and purified islets (C) were processed for RT-PCR analysis. 30 µg of proteins from whole pancreas membranes (B) and from purified islets (D) were subjected to electrophoresis. The different groups are as described in Fig. 1. In A and B, values represent data collected from the number of rats per group (). In C and D, data represent CCK_BR mRNA and protein expression from a pool of several rats' purified islets; the experiment was repeated twice. Results are the means ± SEM, *, $P < 0.01$.

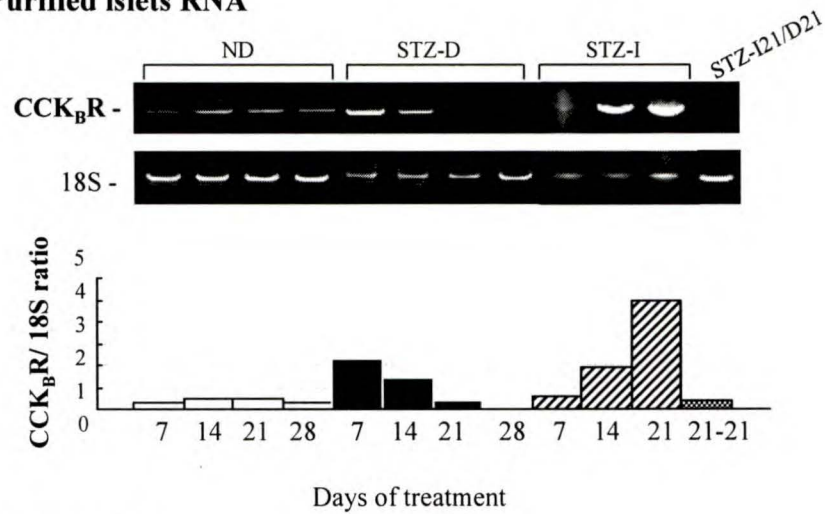
A- Total pancreas RNA



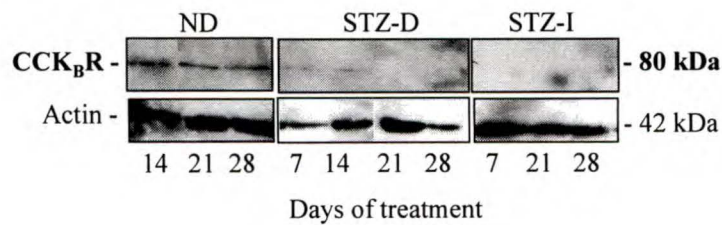
B- Total pancreas membranes



B- Purified islets RNA



D- Purified islets



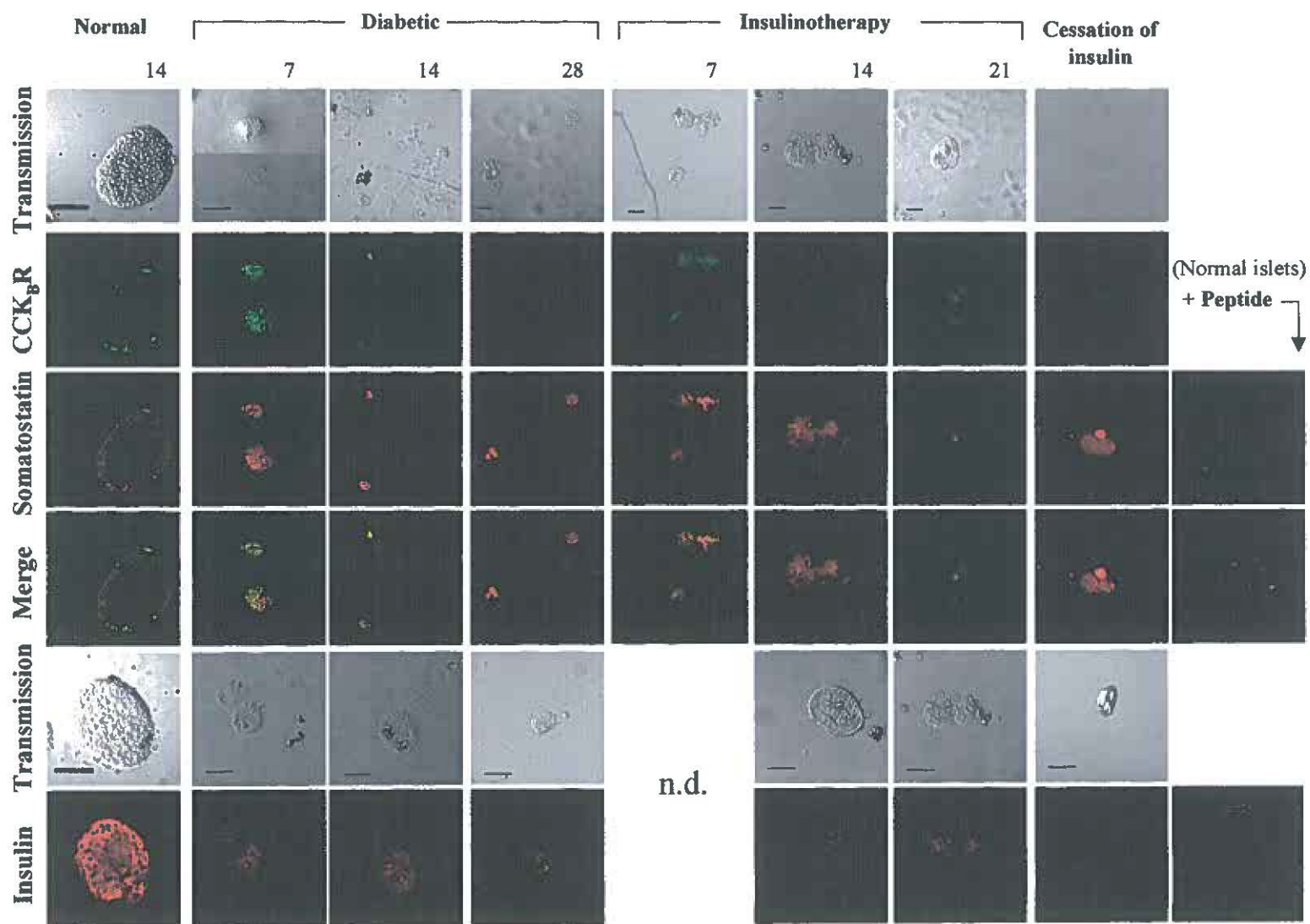
(STZ-I21 vs STZ-D28) and to control levels (STZ-I21 vs ND). Cessation of insulin resulted in another drop of 40.5% in CCK_BR mRNA when compared to the insulin-treated rats (STZ-21/D21 vs STZ-I21). As shown in figure 4B, the CCK_B receptor proteins present in total pancreas membrane proteins followed a comparable pattern of expression as its mRNA except in the diabetic group which did not experience a dramatic drop as its mRNA content. The receptor is visualized as an 80 kDa protein.

With RNA isolated from purified islets (Fig. 4C), we can appreciate the constancy over time in CCK_BR mRNA expression in the control rats (ND). In the diabetic animals, a significant burst of the receptor mRNA is observed after 7 days of the initial streptozotocin injection. Thereafter, a progressive decline is observed over the next 14 days to a complete disappearance after 28 days. Insulin treatment brought CCK_BR mRNA back to control values after 7 days of treatment; after 21 days, we can observe an 8 fold increase in CCK_BR mRNA. Cessation of the insulin treatment for 21 days drove back CCK_BR mRNA to levels of the 21 day diabetic animals.

With proteins extracted from purified islets (Fig. 4D), we can detect the CCK_B receptor even if its concentration seems to be less abundant than in total pancreas (Fig 4B). CCK_B receptor expression remains quite constant with time in nondiabetic islets (ND), while it decreased dramatically within 7 days of diabetes (STZ-D) to a complete loss of the protein after 21 days of diabetes (STZ-D). As observed in total pancreas membranes (Fig. 4B), insulin failed to replenish the CCK_B receptor protein in the purified islets (Fig. 4D) contrary to its effect on CCK_B receptor mRNA expression (Fig. 4C).

Estimation of SS, insulin and CCK_BR proteins expression by confocal microscopy. As shown in Fig. 5 under transmission, diabetes dramatically reduced by at least 10 fold the size of pancreatic islets. Insulin treatment increased their size over time but never to that of a control islet, even after 21 days of treatment. The specificity of the CCK_BR and SS antibodies' signals was demonstrated by the loss of immunofluorescence when the peptide antigen (CCK_BR) and the hormone somatostatin were incubated in the presence of their respective antibody. In normal islets, colocalization of the CCK_BR (green fluorescence) occurred with somatostatin (red fluorescence) as a yellow signal (merged). In the diabetic animals, the loss of beta cells resulted in increased concentration of the CCK_BR and somatostatin after a week, followed by a reduction at 14 days and a loss after 28 days of diabetes, a confirmation of the Western blot data presented in Fig 4D. In response to insulin, the CCK_BR protein reappeared slightly during the hormonal treatment to remain at a low level thereafter, a behaviour totally different from its mRNA content (Fig. 4C). Because the diabetic islets did not recover their normal size during insulin treatment, it is difficult to estimate their somatostatin contents. Indeed, the confocal images seem to indicate that the red immunofluorescence is not as bright during insulin treatment as it is in diabetic islets, a sign of somatostatin reduced content as observed with total pancreas contents evaluation (Fig. 2C). Cessation of insulin did not change the pattern of CCK_BR expression but increased somatostatin content when compared to 21 days of insulin. Recovery of somatostatin after insulin cessation agrees with the increased contents of the hormone observed in Fig. 2C. As shown in Fig. 5, diabetic animals lost their islets' insulin early and their hormone content did not recover upon

Figure 5. Co-localization of the pancreatic CCK_BR with somatostatin and insulin localization in diabetic rats and following insulin treatment. Rats purified islets were incubated overnight at 4°C with the CCK_BR antibody 9262 (1:1000) with the somatostatin antibody (10 µg ml⁻¹) or with insulin (1:50). Co-localization and localization were established by confocal microscopy as described in ref. 29. Calibration bars : 100 µm, 10 µm (see transmission panels).



insulin treatment. The specificity of the insulin antibody is evident from the image obtained with preincubation of the antibody with insulin.

DISCUSSION

In this study, we showed the importance of insulin as a regulator of pancreatic delta cell activity focussed on somatostatin (SS) and cholecystokinin-B receptor (CCK_BR) metabolism. Our data confirm initial observations that pancreatic SS mRNA expression (15) and SS contents in induced-diabetic animals (1,2,5) and in spontaneously diabetic mice (11,12) were significantly increased with a return to control levels upon insulin treatment (15). However, some spontaneous diabetic mice also exhibited decreased pancreatic SS contents (13,14), a finding which remain unexplained. Among our original data, it was demonstrated that 1) the major variations observed during the different treatments on SS mRNA expression in total pancreas samples were identical to those obtained in purified islets; 2) the increases and decreases in SS mRNA were comparable and in synchrony with those of total gland SS contents; 3) insulin negatively and directly modulated pancreatic SS mRNA expression and its hormone contents possibly through the IGF-1 receptor; 4) diabetes resulted in progressive losses in CCK_BR mRNA and protein in total pancreas and purified islets with return to control values in mRNA but not in receptor protein upon insulin treatment; 5) finally, the modifications observed at the biochemical level can be corroborated by our confocal microscopy analysis which has never been done previously.

The validity of our data on SS and CCK_BR variations observed in this study depends on the demonstration that 1) diabetes occurred when induced, 2) it could be controlled by insulin treatment and 3) it reappeared upon cessation of treatment. Our results on body weight decreases, hyperglycemia and hypertriglyceridemia following streptozotocin clearly indicate that diabetes was established early and sustained for 28 days. Furthermore, the observation that all these parameters were normalized upon insulin treatment and became abnormal once again after insulin cessation showed behaviour of diabetic animals (41). Finally, the disappearance of pancreatic amylase during diabetes, its return to normal values during insulin treatment and its loss again after ending insulin treatment support previous data on the effects of diabetes on the pancreas (40) along with the microscopy data showing shrinking of the islets and loss of insulin.

Our data clearly indicate that pancreatic SS mRNA expression is strongly disturbed soon after diabetes induction, more so evident when RNA samples were extracted from purified islets. These increased contents were also rapidly normalized within a week of insulin treatment to rebound after insulin cessation. It is quite interesting to observe that the variations observed in the course of this study on SS mRNA were paralleled by similar changes in SS total pancreatic contents; this observation suggests that these modifications in contents reflect changes in SS synthesis more than in SS accumulation due to inhibition of secretion. This last possibility is doubtful since increased SS secretion was observed previously in alloxan-diabetic rats (8). Then, if controls occur at SS mRNA and protein synthesis level, what are the responsible factors? Earlier studies suggested that glucose could be involved; indeed,

high glucose stimulated SS release from monolayer cultures of neonatal rat pancreas (17) and from rat isolated islets (42), observations not confirmed in another study (43). Increased SS secretion could trigger SS synthesis and glucose was shown to regulate pancreatic preprosomatostatin I expression as it increased SS release from rainbow trout Brockmann bodies (44). In normal and diabetic dogs however, the intravenous administration of exogenous insulin immediately reduced basal SS release, an effect which seems independent of blood glucose level since it occurred both in conditions of normal and hyperglycemia and happened before any change in blood glucose level (19,45). Interestingly, long-term insulin treatment was associated with decreased pancreatic SS contents and SS mRNA expression (15, this study) in conditions of normalized glycemia; these data thus suggest insulin involvement in the regulation of SS gene transcription; our data on the presence of IGF-1 receptors on normal and diabetic islets suggest that insulin may operate through this receptor. Its reduction during diabetes can be explained by the major loss in beta cells following streptozotocin, confirmed by confocal microscopy (Fig.5). The presence of IGF-1 receptor on the RIN-14B cells and the drastic and rapid inhibitory effect of insulin on SS mRNA expression in these cells strongly suggest a direct action of insulin.

Recently, it was shown for the first time that the CCK_BR receptors were present on the endocrine somatostatin delta cells in six different species (28,29). In this study, we present for the first time evidence that the CCK_BR mRNA and protein expressions are modulated differently than SS during diabetes including receptors measured in total gland and in purified islets. The observations that the receptor protein remained in total pancreas membrane during insulin treatment while disappearing from purified

islets strongly suggest that they are not uniquely localized on the delta cells. Indeed, our most recent data indicate its presence on the rat pancreatic acinar cells (46); this receptor population could also be affected by diabetes; this needs to be verified on purified acinar cells free of islets. The loss of islets' CCK_BR protein during diabetes and its failure to reappear during insulin treatment could be explained according to the following two possibilities which at the moment remain speculative. First, convertase enzymes could be activated during diabetes development and then digest the external N-terminal section of the receptor protein; if so, antibody 9262 which specifically recognizes this part of the protein would fail to detect the receptor. Second, diabetes would destabilize the CCK_BR mRNA due to defects in chaperone proteins; this could result in translation of a CCK_BR truncated protein. Such modifications in chaperone proteins have been previously observed during diabetes and resulted in disturbed translation processes involving large mRNA (48).

If SS secretion is stimulated by the CCK agonists gastrin and its analogues (47), accumulation of pancreatic SS content in the diabetic animals (Fig. 2) could be partially explained by the drastic reduction in islets CCK_BR protein as observed in Fig. 4. The observation that SS contents continued to be modulated under insulin treatment and its subsequent cessation in the absence of CCK_BR proteins in islets strongly suggest that this receptor might not be directly involved in SS synthesis and secretion, although this assumption remains to be investigated.

In conclusion, this study clearly demonstrated that the expression of pancreatic somatostatin and the CCK_BR associated with the islets' delta cells, are closely

regulated by insulin in diabetes. Insulin can negatively control SS expression with positive action on CCK_BR mRNA at least. Preliminary data presented in Fig. 3 on RIN-14B cells clearly establish a rapid and direct negative control of insulin on SS mRNA expression in these somatostatin cells. An insulin responsive element was also found on the rat SS gene and studies are undertaken to determine the effects of its deletion on SS mRNA expression. The physiological importance of our data is the demonstration that insulin can control the expression and synthesis of one of its most potent inhibitor. Although we do not yet have any evidence, it remains possible that high pancreatic somatostatin levels are involved in the course of type 2 diabetes development as insulin becomes less and less efficient.

REFERENCES

1. Patel YC, Weir GC. Increased somatostatin content of islets from streptozotocin-diabetic rats. *Clin Endocrinol* 5:191-194, 1976.
2. Orci L, Baetens D, Rufener C, Amherdt M, Ravazzola M, Studer P, Malaisse-Lagae F, Unger RH. Hypertrophy and hyperplasia of somatostatin-containing D-cells in diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 73:1338-1342, 1976.
3. Hellman B, Petersson B. Long-term changes of the alpha1 and alpha2 cells in the islets of Langerhans of rats with alloxan diabetes. *Endocrinology* 72:238-242, 1963.
4. Matsushima Y, Makino H, Kanatsuka A, Yamamoto M, Kumagai A. Immunohistochemical changes of somatostatin cells in the pancreatic islets of rats after streptozotocin administration. *Endocrinol Jpn* 25:111-115, 1978.
5. Patel YC, Cameron DP, Bankier A, Malaisse-Lagae F, Ravazzola M, Studer P, Orci L. Changes in somatostatin concentration in pancreas and other tissues of streptozotocin diabetic rats. *Endocrinology* 103:917-923, 1978.
6. McEvoy RC, Hegre OD. Morphometric quantitation of the pancreatic insulin-, glucagon-, and somatostatin-positive cell populations in normal and alloxan-diabetic rats. *Diabetes* 26:1140-1146, 1977.
7. Patel YC, Wheatley T, Zingg HH. Increased blood somatostatin concentration in streptozotocin diabetic rats. *Life Sci* 27:1563-1570, 1980.
8. Hara M, Patton G, Gerich J. Increased somatostatin release from pancreases of alloxan diabetic rats perfused in vitro. *Life Sci* 24:625-628, 1979.

9. Petersson B, Hellerstrom C, Gunnarsson R. Structure and metabolism of the pancreatic islets in streptozotocin treated guinea pigs. *Horm Metab Res* 2:313-317, 1970.
10. Makino H, Kanatsuka A, Matsushima Y, Yamamoto M, Kumagai A. Effect of streptozotocin administration on somatostatin content of pancreas and hypothalamus in rats. *Endocrinol Jpn* 24:295-299, 1977.
11. Makino H, Matsushima Y, Kanatsuka A, Yamamoto M, Kumagai A, Nishimura M. Changes in pancreatic somatostatin content in spontaneously diabetic mice, as determined by radioimmunoassay and immunohistochemical methods. *Endocrinology* 104:243-247, 1979.
12. Baetens D, Stefan Y, Ravazzola M, Malaisse-Lagae F, Coleman DL, Orci L. Alteration of islet cell populations in spontaneously diabetic mice. *Diabetes* 27:1-7, 1978.
13. Patel YC, Orci L, Bankier A, Cameron DP. Decreased pancreatic somatostatin (SRIF) concentration in spontaneously diabetic mice. *Endocrinology* 99:1415-1418, 1976.
14. Patel YC, Cameron DP, Stefan Y, Malaisse-Lagae F, Orci L. Somatostatin: widespread abnormality in tissues of spontaneously diabetic mice. *Science* 198:930-931, 1977.
15. Papachristou DN, Pham K, Zingg HH, Patel YC. Tissue-specific alterations in somatostatin mRNA accumulation in streptozocin-induced diabetes. *Diabetes* 38:752-757, 1989.

16. Honey RN, Weir GC. Insulin stimulates somatostatin and inhibits glucagon secretion from thebnpperfused chicken pancreas-duodenum. *Life Sci* 24:1747-1750, 1979.
17. Patel YC, Amherdt M, Orci L. Somatostatin secretion from monolayer cultures of neonatal rat pancreas. *Endocrinology* 104:676-679, 1979.
18. Patton GS, Ipp E, Dobbs RE, Orci L, Vale W, Unger RH. Pancreatic immunoreactive somatostatin release. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:2140-2143, 1977.
19. Ribes G, Gross R, Chenon D, Loubatieres-Mariani MM. Effect of insulin on basal pancreaticoduodenal output of somatostatin in normal and diabetic dogs. *Acta Endocrinol* 119:43-50, 1988.
20. Sandberg E, Ahren B, Tandler D, Efendic S. Cholecystokinin (CCK)-33 stimulates insulin secretion from the perfused rat pancreas: studies on the structure-activity relationship. *Pharmacol Toxicol* 63:42-45, 1988.
21. Szecowka J, Lins PE, Efendic S. Effects of cholecystokinin, gastric inhibitory polypeptide, and secretin on insulin and glucagon secretion in rats. *Endocrinology* 110:1268-1272, 1982.
22. Ahren B, Martensson H, Nobin A. Cholecystokinin (CCK)-4 and CCK-8 stimulate islet hormone secretion in vivo in the pig. *Pancreas* 3:279-284, 1988.
23. Ahren B, Lundquist I. Effects of two cholecystokinin variants, CCK-39 and CCK-8, on basal and stimulated insulin secretion. *Acta Diabetol Lat* 18:345-356, 1981.
24. Ahren B, Pettersson M, Uvnas-Moberg K, Gutniak M, Efendic S. Effects of cholecystokinin (CCK)-8, CCK-33, and gastric inhibitory polypeptide (GIP) on

- basal and meal-stimulated pancreatic hormone secretion in man. *Diabetes Res Clin Pract* 13:153-161, 1991.
25. Rossetti L, Shulman GI, Zawulich WS. Physiological role of cholecystokinin in meal-induced insulin secretion in conscious rats. Studies with L 364718, a specific inhibitor of CCK-receptor binding. *Diabetes* 36:1212-1215, 1987.
26. Kawano K, Hirashima T, Mori S, Saitoh Y, Kurosumi M, Natori T. Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. *Diabetes* 41:1422-1428, 1992.
27. Takiguchi S, Takata Y, Funakoshi A, Miyasaka K, Kataoka K, Fujimura Y, Goto T, Kono A. Disrupted cholecystokinin type-A receptor (CCKAR) gene in OLETF rats. *Gene* 197:169-175, 1997.
28. Morisset J, Wong H, Walsh JH, Laine J, Bourassa J. Pancreatic CCK(B) receptors: their potential roles in somatostatin release and delta-cell proliferation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279:G148-156, 2000.
29. Morisset J, Julien S, Lainé J. Localization of cholecystokinin receptor subtypes in the endocrine pancreas. *J Histochem Cytochem* 51:1501-1513, 2003.
30. Curme HG. Multilayer film elements for clinical analysis. *Clin Chem* 24:1335-1342, 1978.
31. Spayd R. Multilayer film elements for clinical analysis. *Clin Chem* 24:1348-1350, 1978.
32. Lacy P.E., Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 16:35-39, 1967.

33. Julien S, Laine J, Morrisset J. Letter to the editor : Langerhans islets purification in diabetic rats. *Pancreas* 27:206-207, 2003.
34. Bhathena SJ, Awoke S, Voyles NR, Wilkins SD, Recant L, Oie HK, Gazdar AF. Insulin, Glucagon, and somatostatin secretion by cultured rat islets cell tumor and its clones. *Proc Soc Exp Biol Med* 175:35-38, 1984.
35. Laine J, Beattie M, Lebel D. Kinetic determination of amylase on microtiter plates : an improved substrate. *Pancreas* 13:217, 1996.
36. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159, 1987.
37. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18:5294-5299, 1979.
38. Calvo EL, Bernatchez G, Pelletier G, Iovanna JL, Morrisset J. Downregulation of IGF-I mRNA expression during postnatal pancreatic development and overexpression after subtotal pancreatectomy and acute pancreatitis in the rat pancreas. *J Mol Endocrinol* 18:233-242, 1997.
39. Morrisset J, Laine J, Bourassa J, Lessard M, Rome V, Guilloteau P. Presence and localization of CCK receptor subtype in calf pancreas. *Regul Peptides* 111:103-109, 2003.
40. Soling HD, Unger KO. The role of insulin in the regulation of α -amylase synthesis in the rat pancreas. *Eur J Clin Invest* 2:199-212, 1972.

41. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 50: 537-546, 2001.
42. Kanatsuka A, Makino H, Matsushima Y, Osegawa M, Kasanuki J, Miyahira M, Yamamoto M, Kumagai A. Effect of glucose on somatostatin secretion from isolated pancreatic islets of normal and streptozotocin-diabetic rats. *Endocrinology* 109: 652-657, 1981.
43. Barden N, Alvarado-Urbina G, Cote JP, Dupont A. Cyclic AMP-dependent stimulation of somatostatin secretion by isolated rat islets of Langerhans. *Biochem Biophys Res Commun* 71: 840-844, 1976.
44. Melroe GT, Ehrman MM, Kittilson JD, Sheridan MA. Glucose regulates pancreatic preprosomatostatin I expression. *FEBS Lett* 465: 115-118, 2000.
45. Schusdziarra V, Lenz N, Schick R, Maier V. Modulatory effect of glucose, amino acids, and secretin on CCK-8-induced somatostatin and pancreatic polypeptide release in dogs. *Diabetes* 35: 523-529, 1986.
46. Biernat M, Julien S, Laine J, Morisset J. Evidence for CCKB receptors on rat pancreatic acinar cells : a role in enzyme secretion ? *Pancreas* 27:372, 2003.
47. Rehfeld JF, Larsson LI, Goltermann NR, Schwartz TW, Holst JJ, Jensen SL, Morley JS. Neural regulation of pancreatic hormone secretion by the C-terminal tetrapeptide of CCK. *Nature* 284: 33-38, 1980.
48. Shi Y, Taylor SI, Sonenberg N. When translation meets metabolism : multiple links to diabetes. *Endocr Rev* 24:91-101, 2003.

II- MATERIEL ET METHODES/ III- RÉSULTATS

Article 4: Sophie Julien, Jean Laine and Jean Morisset. Insulin inhibits somatostatin expression and contents in RIN-14B cells : a cAMP signalling pathway involved ? Diabetes (Soumis).

**INSULIN INHIBITS SOMATOSTATIN EXPRESSION AND CONTENTS IN
RIN-14B CELLS ; A cAMP SIGNALING PATHWAY INVOLVED ?**

Sofi JULIEN, Jean LAINE and Jean MORISSET

Gastroenterology Service, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Université
de Sherbrooke, Sherbrooke, Qc, Canada, J1H 5N4.

Tel : (819) 820-6813 Fax : (819) 820-6826

Email : jean.morisset@Usherbrooke.ca

ABSTRACT

Previous data from our laboratory indicated that insulin can negatively control somatostatin (SS) mRNA expression and SS pancreatic contents in diabetic rats. In this study, RIN-14B cells synthesizing SS were used to characterize the inhibitory effects of insulin and identify a responsible intracellular signaling pathway. Data obtained from cultured RIN-14B cells indicate that the inhibitory effects of insulin on SS mRNA expression are time and concentration dependent but insensitive to glucose concentration. Insulin exhibited a direct potent inhibitory effect on SS synthesis. This inhibition of SS mRNA expression is also dependent upon *de novo* synthesis of one or several unknown proteins because insulin inhibition is reversed by cycloheximide. Finally, prevention of the negative insulinic effects by specific G protein and MEK inhibitors and increased SS expression by a cAMP analogue suggest the implication of a cAMP-dependent intracellular pathway with active MAP kinases and phosphodiesterase to sustain the insulin negative message on SS mRNA expression and SS synthesis. These data support a close interrelationship between insulin and SS metabolism in normal and diabetic rat islets as well as in a SS cell line with potential implications in the pathophysiology of diabetes.

INTRODUCTION

Somatostatin, synthesized and secreted by the delta cells of the endocrine pancreas, is one of the four major hormones present in the islets of Langerhans with glucagon in the alpha cells, insulin in the beta cells and pancreatic polypeptide in the PP cells. The close relationship which exists between these four cell types within the islet has been the subject of many studies above all on the paracrine effect of each hormone between them. Indeed, it is now well accepted in rats and mice that somatostatin inhibits insulin and glucagon secretion (1-3). On the other hand, the effects of insulin on somatostatin secretion are controversial. Indeed, it was reported to inhibit somatostatin release from Brockmann bodies in purified islets of Rainbow trout (4); inhibition of SS secretion was also observed in normal and diabetic dogs in response to an insulin infusion or intravenous injection (5); inhibition by insulin was also observed from isolated perfused rat pancreas (6) or from rat isolated islets (7). At a low background glucose concentration in the perfusate, exogenous insulin infused in an isolated chicken pancreas elicited a clear stimulation of somatostatin release (8). On the contrary, insulin failed to modify somatostatin secretion in isolated dog pancreas (9) or from monolayer cultures of neonatal rat pancreas (10).

In the course of diabetes, several studies described important variations in somatostatin gene expression. Increased SS contents were observed in islets from streptozotocin-diabetic rats (11) along with hypertrophy and hyperplasia of the pancreatic delta cells (12, 13). In these diabetic rats, the increased contents of somatostatin were also observed in the stomach but not in the hypothalamus, two organs rich in somatostatin (14). From the increased contents of SS observed in

diabetic pancreatic delta cells (11), we can assume that their release was also increased as suggested from a previous study in which perfused rat pancreas from diabetic rat increased their SS secretion in response to arginine (15).

In a recent study (16), we confirmed the increased SS pancreatic contents in streptozotocin-diabetic rats, an effect totally reversed by an insulin treatment. We also demonstrated that SS mRNA expression was significantly increased in isolated diabetic islets with a return to control values in response to the insulin treatment. These new data strongly suggested that insulin exerts a negative control on delta cells' SS mRNA expression and total islets' SS contents. However, the mechanisms involved are still unknown.

The two major intracellular signaling pathways activated upon insulin binding to its tyrosine kinase receptors are those involving phosphatidyl-inositol 3 kinase (PI3K) and mitogen-activated-protein kinase (MAPK) activation, respectively. The former pathway seems involved in metabolic controls while the latter would be associated with growth, differentiation and gene expression (17-19). A third pathway has recently been described and involves coupling of the insulin receptor tyrosine kinase with a G-protein leading to physiological responses (20-23). Most interesting is the observation that SS gene transcription can be regulated by cAMP through a cAMP-response element (24).

Our original observations indicated that insulin can negatively control pancreatic SSmRNA expression and SS synthesis in diabetic animals and others documented that SS gene expression can be modulated via a cAMP intracellular pathway. The objectives of this study were to demonstrate that insulin can also affect

SS expression in rat isolated islets and in a cell line which specifically expresses SS to establish that the inhibitory effects of insulin on SS mRNA expression 1) can be reproduced in these cells; 2) are time and insulin-concentration dependent; 3) are affected or not by glucose concentrations; 4) affect SS synthesis and/or secretion; 5) depend on *de novo* protein synthesis and 6) finally involve an intracellular cAMP pathway.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Chemicals. All culture media reagents were obtained from Life Technologies (Burlington, ON). The mouse monoclonal antibody against insulin (2D11-H5) was from Santa Cruz Biotech (Santa Cruz, CA). The somatostatin (Barbar) antibody, further purified by affinity chromatography, was a gift from Dr Brazeau, Université de Montréal, Montréal, Canada. 8-Bromo-cAMP and the specific inhibitor of MEK1/2 (UO126) were purchased from Calbiochem (San Diego, CA) and the specific inhibitor of PI3Kinase (LY294002) was from New England Biolabs (Beverly, MA). The glucagon monoclonal clone K79bB10 antibody, porcine insulin, D-glucose and cycloheximide were purchased from Sigma (Oakville, Ontario).

Animals experiments. Male Sprague Dawley rats, purchased from Charles River Laboratories, Inc.(St-Constant, Canada), were housed in a light and humidity controlled room and given free access to food and water. After an overnight fast, rats (200-220 g) were rendered diabetic by a single intraperitoneal injection of 65 mg/kg body weight streptozotocin (STZ) (Sigma) dissolved in 0.1 M citrate buffer, pH 4.5;

controls received the same volume of citrate buffer alone. Animals were used 7 days after injection. Evidence of diabetes were previously documented (16).

Rat islets isolation and culture. Pancreatic islets were isolated using the collagenase digestion method of Lacy and Kostianovsky (25) as recently described (26). Harvested islets were then cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10 % FBS, 11 mM glucose, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin.

Cell culture. The rat RIN-14B cell line is a secondary clone derived from the RIN-m rat islet cell line (American Type Culture Collection, Manassas, VA). Cells were maintained in RPMI 1640 containing 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, 4.5 g/L glucose, 1.5 g/L sodium bicarbonate, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and supplemented with 10 % fetal bovine serum. Cells were maintained at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. Culture medium was changed every 48h and cells were passed weekly by trypsin-EDTA detachment.

Immunofluorescence microscopy.

PBS-washed RIN-14B cells grown on Labtek chamber slides (Nalge Nunc International, Naperville, IL, USA) were fixed with 4% paraformaldehyde-PBS for 45 minutes at room temperature (RT), blocked with 100mM Glycine-PBS for 20 min at RT and permeabilized with PBS-0.25% Triton X-100 for 30 min at RT. Cells were immunostained overnight at 4°C with the primary antibodies and subsequently incubated 1h at RT with the appropriate secondary antibodies (Rhodamine conjugated fluorochrome 1:100, Molecular Probes).

Islets and RIN-14B cells total RNA extraction and RT-PCR. Total RNA from rat islets and RIN-14B cells was extracted by the single-step guanidinium-isothiocyanate

method (27) with a commercial reagent (TRIZOL[®], Life Technologies). Extracted RNA were quantitated by OD_{260/280} measurements. Equal amounts of isolated RNA (1 µg) were subjected to RT-PCR using the TITANIUM One-Step RT-PCR Kit (Clontech Laboratories, USA). The PCR primers were designed from human somatostatin (Forward primer : 5'-CCCCAGACTCCGTCAGTTTC-3'; reverse primer: 5'- GCAGCCAGCTTTGCGTTCTC-3') with a 231 bp cDNA fragment amplified and from rat actin (sense primer: 5'-ACCACAGCTGAGAGGGGAAATC-3'; antisense primer: 5'-AGAGGTCTTTACGCG-ATGTCAA-3'). Reverse transcription was performed 1h at 50°C and PCR amplifications were performed under the following conditions: SS: 60s 94°C, 45s 60°C, 45s 72°C (35 cycles); Actin : 60s 94°C, 45s 49°C, 45s 72°C (35 cycles). PCR samples were electrophorized on a 1% agarose gel and DNA was visualized by ethidium bromide.

Somatostatin content determinations. RIN-14B cells were scraped in CH₃COOH 2N, heated at 100°C for 15 minutes and centrifuged 20 minutes at 12000 x g. The supernatants as well as culture media with secreted SS were extracted using Waters Sep-Pak C₁₈ cartridges (Waters Associates, Milford, MA) pre-wetted with 100% acetonitrile and equilibrated in 0.05% TFA (15 ml). The cartridges were loaded with cell extracts or acidified media, washed with 0.05% TFA (15 ml) and eluted with 80% acetonitrile in 0.05% TFA (4 ml). The eluates were dried in a vacuum concentrator and stored at -80°C. Somatostatin immunoreactivity was determined by ELISA (Peninsula Laboratories, San Carlos, CA).

Statistical analysis. Results represent means \pm SEM of at least three separate experiments. The statistical analysis was done using a Student's t-test (two tailed). A probability value of <0.05 was considered significant.

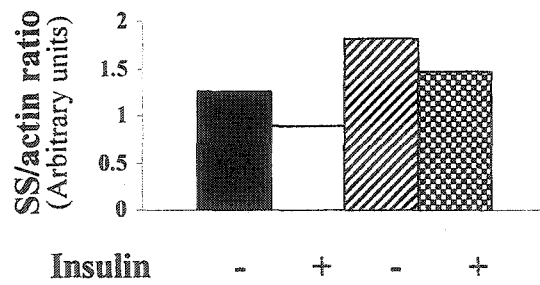
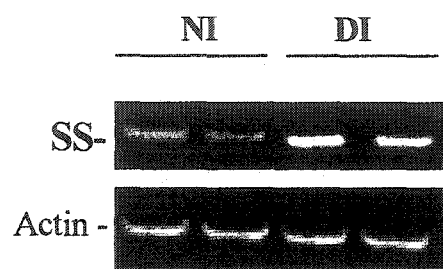
RESULTS

Effects of insulin on SS mRNA expression in purified islets from normal and diabetic rats and in RIN-14B cells. In order to understand how insulin controls SS mRNA expression in diabetic animals (16) it was imperative to set up an *in vitro* cell model. However, to support these studies *in vitro*, it was important to demonstrate that insulin can also modulate SS mRNA expression in isolated islets. As shown in Fig. 1A, islets isolated from normal and diabetic rats exposed to 100 nM insulin for 4 hours presented similar levels of inhibition of SS mRNA expression by 23.8% and 22.1%, respectively. Such *in vitro* inhibitory effects of insulin on islet's SS mRNA expression are reproduced in our selected RIN-14B cell line (Fig. 1B). Indeed, exposition of these cells for 4 hours to 100 nM insulin also resulted in a significant reduction in SS mRNA expression. These data indicate that insulin can control SS mRNA expression not only *in vivo* but also *in vitro* in freshly purified islets and in a cells line know to synthesize SS.

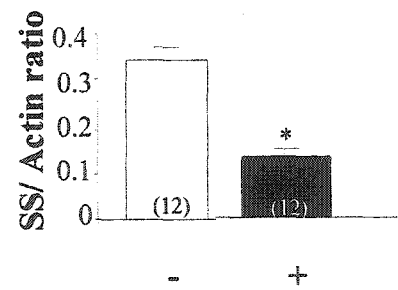
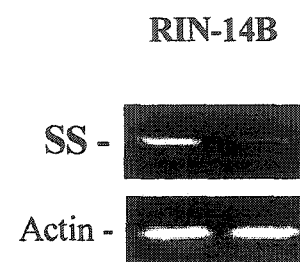
Characterization of the hormones contents of the RIN-14B cells. Before pursuing studies on the effects of insulin's regulation on RIN-14B cells SS mRNA expression, it was important to characterize the hormone contents of these cells to evaluate their

Figure 1. Effects of insulin on SSmRNA expression in purified islets from normal and diabetic rats and from RIN-14B cells. (A) 1500 islets purified from normal (4) and diabetic (8) rats were incubated for 4 h with or without 100 nM insulin. After RNA extraction, 1 μ g of total RNA was processed for RT-PCR analysis. The histogram represents the SS/actin ratio. NI: normal islets; DI: diabetic islets. (B) RIN-14B cells were also exposed for 4h with or without 100 nM insulin. *: Significantly different from control cells at $p < 0.05$.

A.



B.



homogeneity with regard to somatostatin since these cells originally came from a secondary clone of the Rin-m producing-insulin cells. As shown in Fig. 2, it is clear from our immunofluorescence study that the RIN-14B cells are totally free of glucagon (A); we estimated, as indicated in (B), that approximately 1.2% of the cells produced insulin (arrows), whereas close to 99% of the cells synthesized somatostatin (C). These immunofluorescence images with somatostatin being the almost exclusive hormone component of this cell population justify their use for further investigations on the role of insulin in the control of SS expression.

Time course and effects of insulin concentrations on SS mRNA expression in RIN-14B cells. Initial studies with rat purified islets (Fig. 1) indicated that insulin can interfere with SS mRNA expression at 100 nM for 4h. As indicated in Figs 3A and 3B, a significant reduction of 41.1% in SS mRNA expression by 100 nM insulin can be observed at 2h with a maximal inhibition of 53% at 48h. Following this pattern of inhibition, we selected a 4h treatment for the subsequent studies. Data from Figs 3C and 3D clearly demonstrated that after 4h of incubation, increasing concentrations of insulin almost linearly inhibit SS mRNA expression; a significant inhibition of 27.6% was already detected at 1nM insulin and reached 72.4% inhibition at 1 μ M insulin. Our subsequent studies were performed at 100 nM insulin causing a 53.5% inhibition of SS mRNA expression.

Figure 2. Identification of glucagon (A), insulin (B) and somatostatin (C) in the RIN-14B cells by immunofluorescence. Cells were incubated overnight at 4°C with the primary antibodies for glucagon (1:250), insulin (1:50) and somatostatin (1:100). Cells were then washed and incubated with the rhodamine-coupled secondary antibody. The specificity of each antibody has been previously established (38). Figures D to F represent the cells in transmission. The arrows in Fig. B represent cells with insulin.

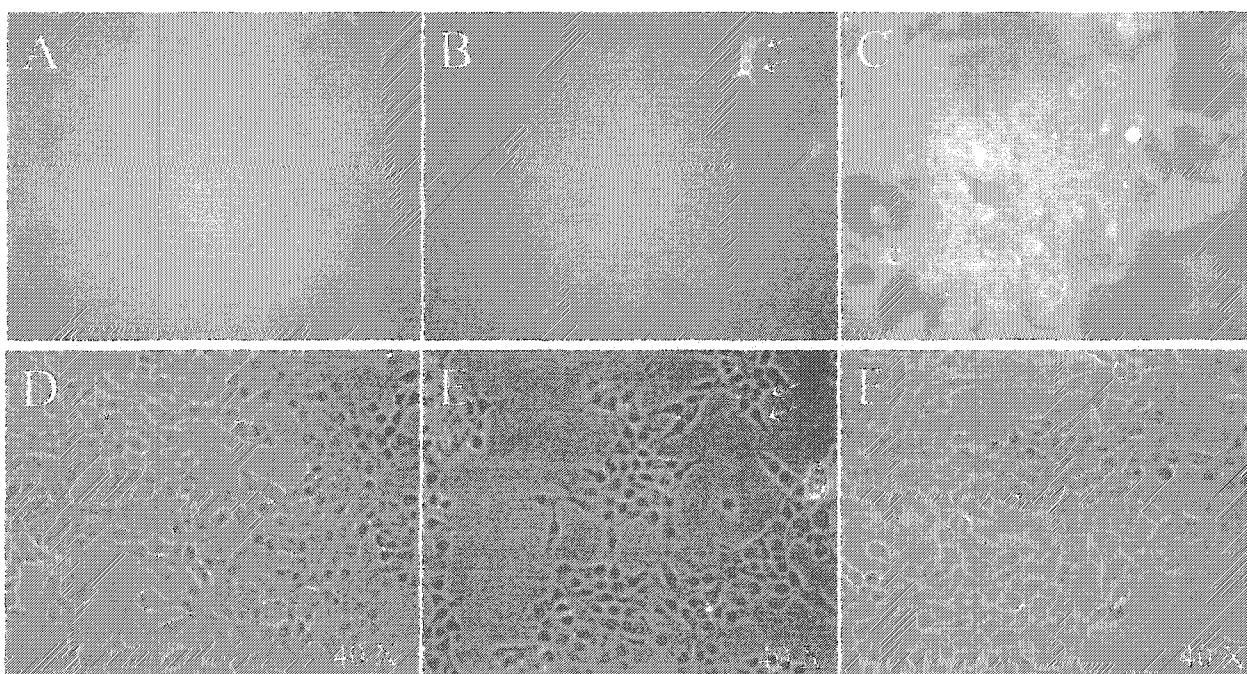
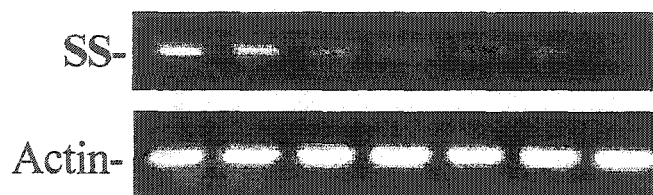
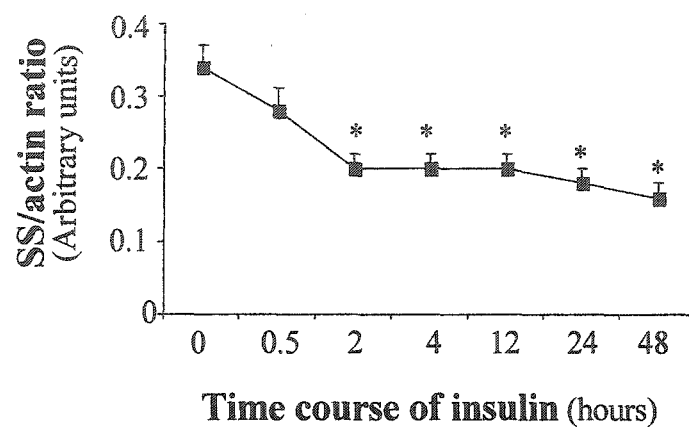


Figure 3. Time course (A, B) and effects of insulin concentrations (C, D) on SSmRNA expression in RIN-14B cells. Cells were incubated in the presence of 100 nM insulin for up to 48h and SSmRNA expression was estimated from extracted RNA by RT-PCR. A) a representative assay from a single group of cells; B) estimation of SSmRNA/actin ratios obtained from 12 separate cell preparations for each time point. C) cells were incubated for 4h with increasing concentrations of insulin; data represent a single group of cells. D) estimation of SS/actin mRNA ratios obtained from 12 separate cell preparations for each concentration. *: significantly different from time 0 or absence of insulin at $p < 0.05$.

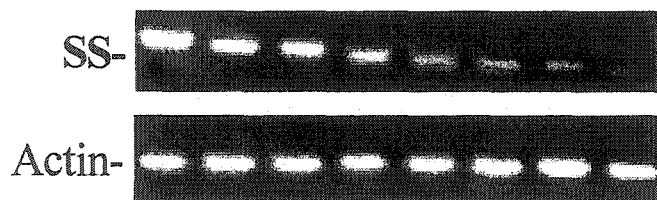
A.



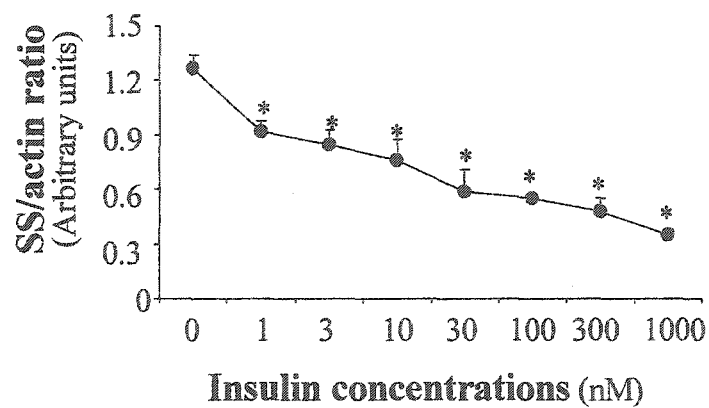
B.



C.



D.

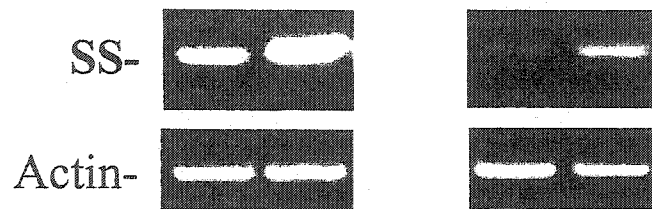


Effects of glucose concentrations on the effects of insulin on SS mRNA expression in RIN-14B cells. Since the ATCC suggested to culture these RIN-14B cells in a 30 mM glucose medium, it was important to establish whether or not the inhibitory action of insulin on SS mRNA expression was glucose dependent. As observed in Fig. 4A, in the absence of insulin, cells incubated for 4 h in the presence of 30 mM glucose exhibited an 80% higher expression of SS mRNA than those cultured in 2.8 mM glucose. Therefore, high concentrations of glucose have a direct effect on SS mRNA expression in these cells. However, when we look at the effects of insulin, it is clear that its inhibitory action on SS mRNA expression is independent of glucose concentration. Indeed, when we compare data presented in Figs 4A and 4B, we can see that at 2.8 mM glucose, insulin reduced SS mRNA expression by 60.6% with a comparable inhibition of 52.8% at 30 mM glucose.

Effects of insulin on RIN-14B somatostatin contents and secretion. If insulin has such a major inhibitory effect on SS mRNA expression, and so rapidly, the end result of such an inhibition should be a reduction in cells' SS contents and/or secretion. As shown in Fig. 5, SS contents of the RIN-14B cells increased by 161% over a 48h period of incubation probably as a result of cell proliferation. In the presence of 100 nM insulin, SS contents are dramatically reduced by 94%, a clear evidence of reduced synthesis. These RIN-14B cells are quite active as they secreted 76.8 % of their total SS content over a 48 h period of incubation. However, it was impossible to estimate

Figure 4. Effects of insulin at two glucose concentrations on SSmRNA expression in RIN-14B cells. Cells were incubated for 4h in low (2.8 mM) and high (30 mM) glucose medium in the presence or not of 100 nM insulin. RNA were extracted and SSmRNA evaluated by RT-PCR. A) Representative assay from a single cell preparation. B) Evaluation of SS/actin mRNA ratios from 18 different cell preparations. † and ‡: significantly different from their respective control at $p < 0.05$.

A.



B.

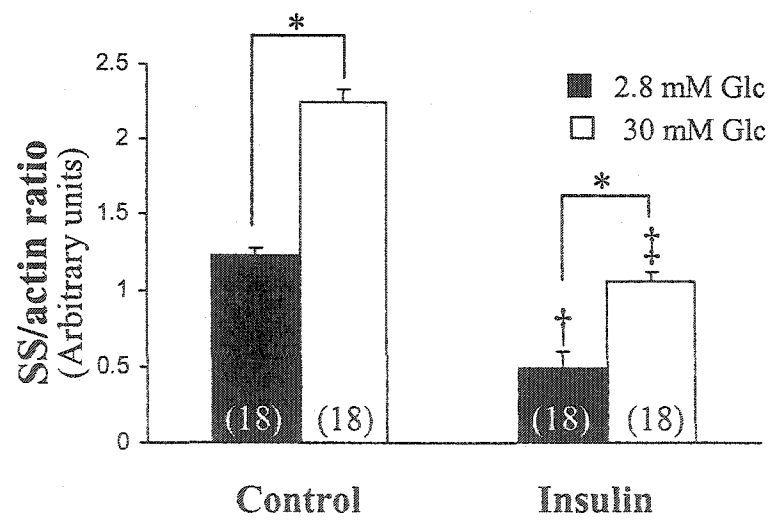
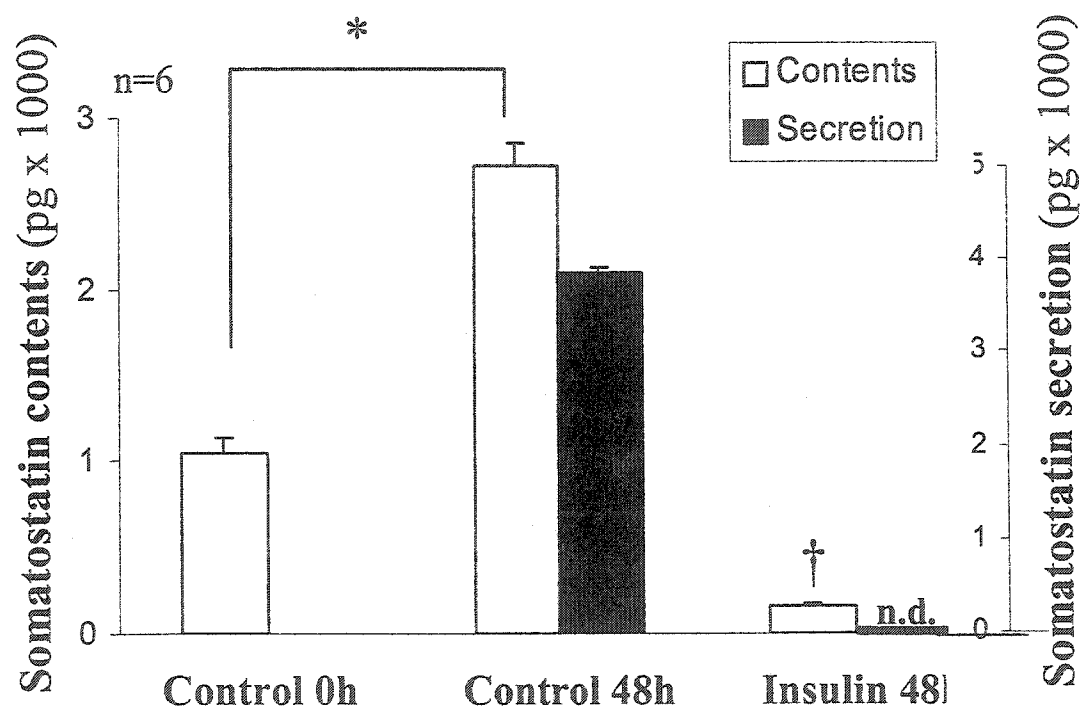


Figure 5. Effects of insulin on RIN-14B somatostatin contents and secretion. SS contents were measured at 0 and 48h in the control and insulin groups treated every 12h with 100 nM insulin; media were changed every 12h for SS secretion estimation. Secretion at 48h (black columns) represents the cumulative release of SS into the medium every 12h. †: significantly different from control values at 48h at $p < 0.05$; n.d : not detectable.



SS secretion of these cells after 48 hours of insulin because the amount secreted was beyond detection due to the tremendous decreases in their total SS content.

Effects of cycloheximide on SS mRNA expression in control and insulin-treated RIN-14B cells. In order to establish that the inhibitory effects of insulin on SS mRNA expression and SS synthesis depend on *de novo* protein synthesis, RIN-14B cells were incubated with or without insulin in the presence or not of $1\mu\text{g ml}^{-1}$ of cycloheximide, a concentration known to inhibit protein synthesis (28). As shown in Fig. 6, after 4h of incubation, insulin significantly reduced SS mRNA expression, an inhibition not significantly affected by cycloheximide. However, if the incubation period is prolonged to 8h, cycloheximide alone significantly reduced SS mRNA expression by 43% and the inhibition by insulin reached 63%; on the contrary, the combination of cycloheximide with insulin reduced by 45.6% the inhibition of SS mRNA caused by insulin. These data clearly indicate that the inhibition of SS mRNA expression and SS synthesis in the RIN-14B cells depends on *de novo* synthesis of one or several newly synthesized proteins since both processes were partially prevented by cycloheximide.

Signaling pathway involved in insulin control of SS mRNA expression. Our preliminary data (16) indicated that insulin had a direct effect on the RIN-14B cells to regulate SS mRNA expression probably via the IGF-1 receptor present on these cells. Since SS expression is preferentially regulated through a cAMP pathway activation

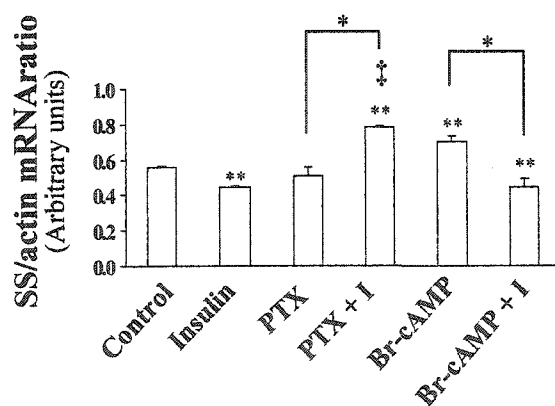
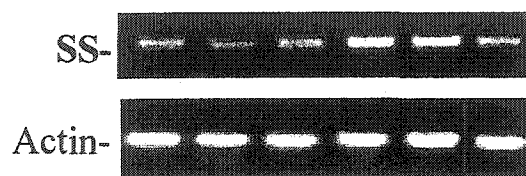
Figure 6. Effects of cycloheximide on SSmRNA expression in control and insulin-treated RIN-14B cells. Cells were incubated for either 4 or 8h with or without insulin (I) (100 nM) and with or without cycloheximide (CHX) 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$. RNA were extracted and SS and actin mRNA were estimated by RT-PCR. A) Representative assays from a single preparation in each group at 4 and 8h. B) Evaluation of SS/actin mRNA ratios of six cell preparations per group at 4 and 8 h. *: significantly different from their respective control at $p < 0.05$; **: Insulin (I) significantly different from insulin with cycloheximide (CHX + I) at $p < 0.05$.

via the cis-regulatory element CRE (cAMP response element) present in the promoter region of the SS genes (29, 30), it became important to investigate this pathway to understand the negative effects of insulin. Therefore, we determined the effects of stimulatory and inhibitory agents of this cAMP pathway on SS mRNA expression following a 4h incubation with 100 nM insulin. As shown in Fig. 7A, preincubation of the cells for 2h with 500 ng ml⁻¹ of pertussis toxin (PTX), a specific Gi inhibitor, prevented the inhibitory effect of insulin. If the cAMP-dependent pathway is involved in SS expression, addition of a relatively stable cAMP analogue, Br-cAMP, should increase SS mRNA expression; indeed, 1 μ M Br-cAMP significantly increased SS mRNA expression by 20% over control, an effect reduced by 37.1% upon insulin addition to 8 Br-cAMP, this last effect was unexpected.

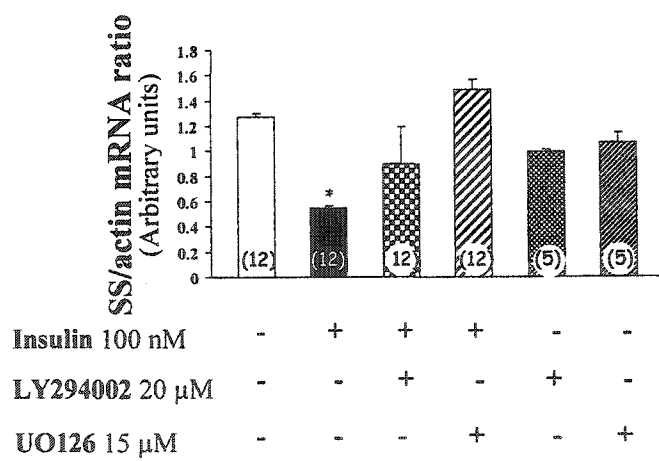
We then investigated cellular events occurring between insulin binding to its receptor and the inhibition potentially linked to the cAMP-dependent pathway leading to SS mRNA expression. Following specific PI3 Kinase inhibitor LY294002 (20 μ M) and specific MEK inhibitor U0126 (15 μ M) preincubation for 30 min, the inhibition of SS mRNA expression by insulin was partially but not significantly prevented by the PI3 Kinase inhibitor and totally reversed by the MEK inhibitor as shown in Fig. 7B. These data support a strong involvement of the MAP kinase pathway in the negative regulation of SS expression by insulin.

Figure 7. Signaling pathways involved in insulin control of SSmRNA expression in RIN-14B cells. A) Cells were preincubated for 2h with 500 ng ml⁻¹ pertussis toxin (PTX), a specific inhibitor of Gi or with 1 μM of the cAMP analogue 8-bromo-Camp (Br-cAMP). Insulin (I) 100 nM was then added for 4h in the indicated groups. B) Cells were preincubated for 30 min with the specific PI3 kinase (LY294002: 20 μM) or MEK (UO12615: 15μM) inhibitors, and then incubated with or without insulin (100 nM) for 4h. In both sets of experiments, RNA were extracted and SS and actin mRNA estimated by RT-PCR. Results represent SS/actin mRNA ratios of 4 (A) and 5 to 12 (B) cell preparations per group. ** significantly different from control at $p < 0.05$. ‡: significantly different from insulin at $p < 0.05$.

A.



B.



Insulin 100 nM	-	+	+	+	-	-
LY294002 20 μ M	-	-	+	-	+	-
UO126 15 μ M	-	-	-	+	-	+

DISCUSSION

The major objectives of this study were 1) to confirm *in vitro* our previous *in vivo* observations (16) that insulin caused significant decreases in SS mRNA expression and SS islets' accumulation in diabetic rats; 2) to establish the RIN-14B cells as a good model to study the effects of insulin on SS metabolism; 3) to characterize the effects of insulin on SS metabolism and 4) to identify potential intracellular signaling pathways stimulated by insulin and leading to its negative control of SS expression.

Among our original data, it was demonstrated that 1) insulin can exert its negative control on SS mRNA expression directly *in vitro* on purified islets not only from diabetic but also from normal rats as it did *in vivo* (16); 2) the RIN-14B cells can serve as a model of choice to study SS metabolism in response to insulin as they possess the IGF-1 receptor likewise the normal islets' delta cells (16) and synthesize almost exclusively SS; 3) the effects of insulin on SS mRNA expression are time and concentration dependent and independent of glucose concentration; 4) insulin reduced SS synthesis; 5) the inhibitory effects of insulin on SS mRNA expression require *de novo* synthesis of one or several proteins; 6) and finally, insulin may operate through an intracellular cAMP-dependent signaling pathway to control SS mRNA expression and the hormone's synthesis.

Before using the RIN-14B cells to investigate the role of insulin in the control of SS expression, it was important to reproduce *in vitro* our *in vivo* findings that insulin negatively controlled the expression of SS. Our data clearly indicate that indeed insulin can suppress within 4h SS mRNA expression in purified islets from

control and diabetic rats. These findings stress the importance of insulin acting not only on islets from diabetic animals but also on islets from normal rats, and point to the fact that insulin can directly operate on delta cells without interference from *in vivo* neuronal and/or hormonal origin.

Any physiological studies on purified islets and specially on the somatostatin delta cells remain difficult because of the low amount of delta cells (3%) in a normal islets and above all because of the paracrine effects that the different cell types exert on each other (1, 4, 5). Therefore, a somatostatin cell line was mandatory to elucidate how insulin controls SS expression. The RIN-14B cells were selected because they predominantly secrete somatostatin (31) and synthesize most exclusively somatostatin as shown in Fig. 2. Furthermore, as shown in Fig. 1B, insulin at 100 nM for 4h reduced SS mRNA expression by 62% in these cells.

It was also important to demonstrate that the inhibitory effects of insulin were time and concentration dependent. We were surprised to observe a positive inhibition as soon as 30 min which became significant at 2h, along with a linear significant inhibition from 1 to 1000 nM insulin. Such an early effect is compatible with the inhibition also observed at 4h in isolated islets as indicated in Fig. 1A. Although glucose significantly increased SS gene expression under control and insulin stimulation as previously observed in Brockmann bodies of Rainbow trout (32), the inhibitory effect of insulin remained however independent of the glucose concentration in the medium as the percentages of inhibition were comparable at low and high glucose concentrations.

Over time, the constant inhibition of SS gene expression by insulin should result in altered SS synthesis and/or secretion. In the absence of insulin, the RIN-14B cells significantly increased their SS contents over 48h. On the contrary, the constant presence of the hormone in the medium for 48h drastically reduced the SS contents of these cells even below levels observed at time zero, a clear effect on SS synthesis. This inhibitory action of insulin on SS synthesis has also been previously documented in fetal rat pancreas in organ culture (33). Although we were unable to estimate SS secretion after 48 h of exposure to insulin, it was previously observed that insulin increased SS release in these same cells (31). In other systems, the effects of insulin on SS secretion were usually inhibitory as observed in Rainbow trout (4), on pre-cultivated rat islets (7) or without effect as demonstrated from monolayer cultures of neonatal rat pancreas (10) or from isolated rat islets (34).

Insulin is known for its positive metabolic actions including stimulation of protein synthesis (17-19). However, can we relate any of its inhibitory effects on *de novo* synthesis of a single or several proteins ? Our data clearly indicate that the impaired protein synthesis in the presence of cycloheximide led to a significant reduction of the inhibition caused by insulin on SS mRNA expression after 8h; the time needed to obtain such an inhibition relief agrees with the *de novo* synthesis of proteins, their processing and their availability for physiological actions. Our data from cells of pancreatic origin and treated with insulin are quite similar to those obtained from fetal rat hypothalamic cells in culture treated with transforming growth factor β 1 (35). Indeed, TGF- β 1 inhibited SS mRNA levels in those hypothalamic cells as insulin did in the RIN-14B cells. Furthermore, this TGF- β 1 inhibition was

also prevented by cycloheximide, a requirement for *de novo* protein synthesis as well. In that study total inhibition recovery by cycloheximide occurred within 4h while we saw a significant relief at 8h. The time difference could be explained by the high synthetic rates of SS synthesis in the RIN-14B cancerous cells compared to those of normal hypothalamic cells in culture composed of multiple cell types beside those of somatostatin. Although it is quite evident that newly synthesized protein(s) are required to carry on the inhibitory action of insulin on SS gene expression, their identity and nature still remain unknown for the time being.

Finally, our studies on the intracellular pathways involved in the control of SS gene expression by insulin led us to interpretation and open questions. On one hand, it is clear that the PI3-kinase pathway is not or minimally involved since its specific inhibitor, LY 294002, did not reserve the inhibitory action of insulin. The MAP kinase pathway on the other hand is known for its control of mitogenic reactions and specific genes expression (17-19). However, this pathway also seems to be involved in insulin action since the specific MEK inhibition by U0126 totally prevented the inhibitory effect of insulin. This is new to us and was never reported before. It remains now to be understood how this MAP kinase pathway can be related to that of cAMP since SS expression is mostly regulated by the cyclic AMP pathway via the cis-regulator element CRE (cAMP response element) present in the promoter region of the SS gene (29, 30).

From our data presented in Figs. 7A and 7B, we can propose the following hypothesis to explain the negative control of insulin on the SS gene expression. Activation of the insulin receptor would couple an inhibitory G_i protein that mediates

$\beta\gamma$ -dependent MAPK activation which would subsequently activate and phosphorylate a phosphodiesterase (PDE). Such a PDE activation would then hydrolyze cAMP thus impairing CREB phosphorylation, resulting in decreased SS gene activation. Such a pathway is supported by the following previous observations indicating that 1) the insulin receptors can bind Gi protein (22); 2) such a coupling can mediate $\beta\gamma$ -dependent MAPK activation (36); 3) ERK2 can bind, phosphorylate and regulate a cAMP-specific phosphodiesterase (PDE) (37). The data presented in Figs. 7A and 7B certainly support such a pathway. Indeed, inactivation of the protein Gi by pertussis toxin totally prevented the inhibition by insulin of SSmRNA expression; furthermore, inhibition of MEK by its specific inhibitor UO126 also blocked the effect of insulin. Finally, the addition of Br-cAMP significantly augmented SSmRNA expression above control but did not prevent the inhibitory effect of insulin. This last result can be explained by the insulin-activated PDE hydrolyzing intracellular cyclic nucleotides, thus preventing their action.

In conclusion, this study clearly demonstrates that insulin can directly inhibit SS mRNA expression in normal and diabetic rat islets and in a SS-synthesizing cell line, the RIN-14B. Beside the usual time and concentration studies describing the rapidity and the efficacy of the insulin action, it is important to stress that insulin operates independently of glucose concentration in the medium, needs *de novo* protein synthesis and inhibits SS synthesis. Finally, our preliminary data on the intracellular mechanisms involved point to a cAMP-dependent pathway with activation of a phosphodiesterase by insulin. Further studies are clearly needed to document our working hypothesis.

REFERENCES

1. Strowski MZ, Parmar RM, Blake AD, Schaeffer JM. Somatostatin inhibits insulin and glucagon secretion via two receptors subtypes: an in vitro study of pancreatic islets from somatostatin receptor 2 knockout mice. *Endocrinology* 141:111-117,2000.
2. Tirone TA, Norman MA, Moldovan S, DeMayo FJ, Wang XP, Brunnicardi FC. Pancreatic somatostatin inhibits insulin secretion via SSTR-5 in the isolated perfused mouse pancreas model. *Pancreas* 26:e67-73,2003.
3. Strowski MZ, Kohler M, Chen HY, Trumbauer ME, Li Z, Szalkowski D, Gopal-Truter S, Fisher JK, Schaeffer JM, Blake AD, Zhang BB, Wilkinson HA. Somatostatin receptor subtype 5 regulates insulin secretion and glucose homeostasis. *Mol Endocrinol* 17:93-106,2003.
4. Eilertson CD, Kittilson JD, Sheridan MA. Effects of insulin, glucagon, and somatostatin on the release of somatostatin-25 and somatostatin-14 from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, pancreatic islets in vitro. *Gen Comp Endocrinol* 99:211-220,1995.
5. Ribes G, Gross R, Chenon D, Loubatieres-Mariani MM. Effect of insulin on basal pancreaticoduodenal output of somatostatin in normal and diabetic dogs. *Acta Endocrinol* 119:43-50,1988.
6. Gerber PP, Trimble ER, Wollheim CB, Renold AE. Effect of insulin on glucose- and arginine-stimulated somatostatin secretion from the isolated perfused rat pancreas. *Endocrinology* 109:279-283,1981.

7. Schafer G, Schnellbacher-Daum G, Heyer AE, Schatz H. Somatostatin release from freshly isolated and cultured rat islets in response to rat insulin and to anti-insulin serum. *Diabetes Res* 2:201-205, 1985.
8. Honey RN, Fallon MB, Weir GC. Effects of exogenous insulin, glucagon, and somatostatin on islet hormone secretion in the perfused chicken pancreas. *Metabolism* 29:1242-1246, 1980.
9. Patton GS, Ipp E, Dobbs RE, Orci L, Vale W, Unger RH. Pancreatic immunoreactive somatostatin release. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:2140-2143, 1977.
10. Patel YC, Amherdt M, Orci L. Somatostatin secretion from monolayer cultures of neonatal rat pancreas. *Endocrinology* 104:676-679, 1979.
11. Patel YC, Weir GC. Increased somatostatin content of islets from streptozotocin-diabetic rats. *Clin Endocrinol* 5:191-194, 1976.
12. Orci L, Baetens D, Rufener C, Amherdt M, Ravazzola M, Studer P, Malaisse-Lagae F, Unger RH. Hypertrophy and hyperplasia of somatostatin-containing D-cells in diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 73:1338-1342, 1976.
13. Matsushima Y, Makino H, Kanatsuka A, Yamamoto M, Kumagai A. Immunohistochemical changes of somatostatin cells in the pancreatic islets of rats after streptozotocin administration. *Endocrinol Jpn* 25:111-115, 1978.
14. Patel YC, Cameron DP, Bankier A, Malaisse-Lagae F, Ravazzola M, Studer P, Orci L. Changes in somatostatin concentration in pancreas and other tissues of streptozotocin diabetic rats. *Endocrinology* 103:917-923, 1978.

15. Hara M, Patton G, Gerich J. Increased somatostatin release from pancreases of alloxan diabetic rats perfused in vitro. *Life Sci* 24:625-628, 1979.
16. Julien S, Laine J, Morisset J. Regulation of rat pancreatic CCKB receptor and somatostatin expression by insulin. *Diabetes* 53:2004 (In press).
17. Kido Y, Nakae J, Accili D. Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets. *J Clin Endocrinol Metab* 86:972-979, 2001.
18. Le Roith D, Zick Y. Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes Care* 24:588-597, 2001.
19. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806, 2001.
20. Wesslau C, Eriksson JW, Smith U. Cellular cyclic AMP levels modulate insulin sensitivity and responsiveness--evidence against a significant role of Gi in insulin signal transduction. *Biochem Biophys Res Commun* 96:287-293, 1993.
21. Pertseva MN, Shpakov AO, Plesneva SA, Kuznetsova LA. A novel view on the mechanisms of action of insulin and other insulin superfamily peptides: involvement of adenylyl cyclase signaling system. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 134:11-36, 2003.
22. Ferreira IA, Eybrechts KL, Mocking AI, Kroner C, Akkerman JW. IRS-1 mediates inhibition of Ca²⁺ mobilization by insulin via the inhibitory G-protein Gi. *J Biol Chem* 279:3254-3264, 2004.
23. Kreuzer J, Nurnberg B, Krieger-Brauer HI. Ligand-dependent autophosphorylation of the insulin receptor is positively regulated by Gi-proteins. *Biochem J* 2004 (In press).

24. Montminy MR, Sevarino KA, Wagner JA, Mandel F, Goodman RH. Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:6682-6686,1986.
25. Lacy P.E., Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 16:35-39, 1967.
26. Julien S, Laine J, Morrisset J. Letter to the editor : Langerhans islets purification in diabetic rats. *Pancreas* 27:206-207, 2003.
27. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159, 1987.
28. Helinek TG, Devlin TM, Ch'ih JJ. Initial inhibition and recovery of protein synthesis in cycloheximide-treated hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 31:1219-1225, 1982.
29. Leonard J, Serup P, Gonzalez G, Edlund T, Montminy M. The LIM family transcription factor Isl-1 requires cAMP response element binding protein to promote somatostatin expression in pancreatic islet cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6247-6251,1992.
30. Vallejo M, Miller CP, Habener JF. Somatostatin gene transcription regulated by a bipartite pancreatic islet D-cell-specific enhancer coupled synergetically to a cAMP response element. *J Biol Chem* 267:12868-12875,1992.
31. Bhathena SJ, Awok S, Voyles NR, Wilkins SD, Recant L, Oie HK, Gazdar AF. Insulin, glucagon, and somatostatin secretion by cultured rat islets cell tumor and its clone. *Proc Soc Exp Biol Med* 175:35-38, 1984.

32. Ehrman MM, Melroe GT, Kittilson JD, Sheridan MA. Glucose-stimulated somatostatin gene expression in the Brockmann bodies of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) results from increased mRNA transcription and not from altered mRNA stability. *Zoolog Sci* 21:87-91,2004.
33. McEvoy RC. Fetal rat pancreas in organ culture: effects of exogenous insulin on the development of the islet cells. *Horm metab Res* 13:5-8,1981.
34. Murakami K, Taniguchi H, Tamagawa M, Ejiri K, Baba S. Modulation of somatostatin release by endogenous glucagon and insulin: physiological relationship between A, B and D cells in rat pancreatic islets. *Endocrinol Jpn* 29:503-508,1982.
35. Quintela M, Senaris RM, Dieguez C. Transforming growth factor-betas inhibit somatostatin messenger ribonucleic acid levels and somatostatin secretion in hypothalamic cells in culture. *Endocrinology* 138:4401-4409,1997.
36. Kuemmerle JF, Murthy KS. Coupling of the insulin-like growth factor-I receptor tyrosine kinase to Gi2 in human intestinal smooth muscle: G $\beta\gamma$ -dependent MAP kinase activation and growth. *J Biol Chem* 276:7187-7194, 2001.
37. MacKenzie SJ, Baillie GS, McPhee I, Bolger GB, Houslay MD. ERK2 mitogen-activated protein kinase binding, phosphorylation, and regulation of the PDE4D cAMP-specific phosphodiesterases. The involvement of COOH-terminal docking sites and NH2-terminal UCR regions. *J Biol Chem* 275:16609-16617, 2000.
38. Morisset J, Julien S, Laine J. Localization of cholecystokinin receptor subtypes in the endocrine pancreas. *J Histochem Cytochem* 51:1501-1513, 2003.

IV- DISCUSSION GÉNÉRALE

Brièvement, nos objectifs étaient de caractériser d'une part les changements métaboliques de la somatostatine dans la cellule delta pancréatique au cours du diabète et suite à une insulinothérapie puis d'identifier la ou les voies de signalisation capable(s) de médier les effets observés d'autre part.

Pour ce faire, nous avons utilisé différentes méthodes qui nous ont permis d'atteindre nos objectifs présentés dans le chapitre précédent. Dans ce chapitre-ci, nous allons discuter de manière générale tous les aspects qui ont dirigé cette recherche ainsi que les résultats obtenus en prenant en compte d'autres travaux publiés dans la littérature.

1- L'îlot de Langerhans : modèle d'étude de la physiologie des cellules delta à somatostatine.

Le but de la recherche scientifique a toujours été de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine du développement des pathologies comme le cancer ou le diabète. La culture cellulaire reste jusqu'à maintenant l'outil le plus employé pour étudier les processus physiologiques et pathologiques au sein de tissus complexes comme le pancréas qui comprend différents types cellulaires à savoir les cellules acinaires, ductales et endocrines. Ces dernières sont au moins au nombre de quatre, les cellules bêta, alpha, PP et delta au sein de l'îlot de Langerhans qui est la composante tissulaire du pancréas principalement altérée au cours du diabète. Étant donné la prévalence toujours grandissante du diabète dans le monde (90

millions en 1980, 175 millions en 2003), la culture des îlots de Langerhans a fait l'objet d'intensives recherches durant cette dernière décennie. Les méthodes d'isolation, de purification et de culture des îlots normaux sont en constante amélioration dans le but de rendre leur transplantation toujours plus efficace pour le traitement du diabète de type I (Lacy and Kostianovsky, 1967; Weber et al., 1977; Hober et al., 1997; Kenmochi et al., 2000). Mais la transplantation des îlots n'est pas le seul but pour l'amélioration de ces techniques. En effet, l'étude des mécanismes paracrines impliquant les hormones pancréatiques est très importante pour la compréhension du développement du diabète. Dans le cadre de notre recherche, les îlots purifiés normaux semblent un bon modèle pour étudier le rôle de l'insuline sur la physiologie de la somatostatine puisque l'architecture de l'îlot reste intacte lorsque les conditions d'isolation et de culture sont optimales. Nous nous sommes donc assurés au départ de notre recherche que notre technique d'isolation des îlots de Langerhans de rat était efficace, d'une part par l'observation morphologique et comparative de nos îlots de rats avec des îlots humains en microscopie confocale, et d'autre part par leur capacité à pouvoir sécréter les hormones insuline et somatostatine. Dans l'article «The rat pancreatic islets a reliable tool to study islet responses to cholecystikinin receptor occupation», nous avons en effet comparé en microscopie confocale des îlots isolés de pancréas humain adulte et fœtal avec des îlots isolés de pancréas de rat. Les images obtenues en transmission démontrent très bien que l'architecture des îlots est conservée après leur isolation puisqu'ils apparaissent comme des structures relativement arrondies, isolées, bien délimitées et dépourvues de toutes adhésions tissulaires exocrines démontrant ainsi l'efficacité de purification de la technique

utilisée, décrite par Lacy and Kostianovsky en 1967. Le rendement, environ 800 ± 120 par pancréas de rat, et la qualité des îlots ainsi obtenus sont comparables à ceux issus d'autres études effectuées chez le hamster ou le chien (Ilieva et al., 1999; Wang and Rosenberg, 2001). Ceci nous permet aussi d'apprécier l'efficacité de cette technique lorsqu'on observe certaines études présentant des îlots humains fœtaux et adultes comme des amas de cellules dispersées ayant perdu l'architecture et la morphologie décrite précédemment (Saillan-Barreau et al., 1999). En effet, la morphologie des îlots de pancréas de rats et de fœtus humain, purifiés à partir de la méthode de Lacy et Kostianovsky est comparable à celle des îlots de pancréas humain isolés à partir d'une autre technique décrite par Wang and Rosenberg, 1999 basée elle aussi sur une digestion du pancréas exocrine avec la collagénase puis d'une isolation des îlots dans un gradient discontinu de Ficoll. Ces différentes méthodes, même si elles conservent l'architecture des îlots, brisent quand même l'interface tissulaire endocrine/exocrine présente dans le pancréas impliquant une destruction de la lame basale entourant l'îlot ainsi que le réseau vasculaire (Wang and Rosenberg, 1999 ; Jansson and Carlsson, 2002). Pourtant, malgré cette destruction de la matrice extracellulaire entourant l'îlot, les phénotypes cellulaires restent intacts. En effet, nos résultats d'immunofluorescence présentés dans l'article 2, des hormones insuline, glucagon et somatostatine démontrent en effet que les îlots suite à leur isolation puis leur culture pendant 48 heures continuent de produire les hormones dans les proportions retrouvées dans le pancréas *in vivo*, à savoir 85% de cellules à insuline, 10 % de cellules à glucagon et 4 % de cellules à somatostatine. La capacité des îlots à pouvoir encore produire les hormones dans des conditions *in vitro* suggère que les

cellules sont fonctionnelles qu'elles soient centrales dans l'îlot (cellules bêta) ou périphériques (cellules delta). On pourrait en effet supposer que la perte de la matrice extracellulaire et de la lame basale pourrait en partie entraîner une perte des cellules périphériques de l'îlot, notamment les cellules delta. Mais nous avons démontré que les cellules bêta et delta pouvaient libérer leur contenu hormonal respectif lorsque les îlots étaient stimulés par des sécrétagogues. Ainsi, 16 mM glucose sur 2 heures peuvent induire une stimulation de 400 % de la sécrétion d'insuline à partir d'îlots de rats isolés et cultivés 48 heures avant l'essai, comparativement à des îlots en présence de 5.6 mM Glc. Le forskolin et l'IBMX, tous deux des activateurs de l'enzyme adénylate cyclase sont capables de stimuler la sécrétion de somatostatine. Ces résultats démontrent que notre technique de purification des îlots de rats et leur condition de culture sur 48 heures sont adéquates puisque d'une part les îlots conservent leur morphologie et architecture et qu'ils sont viables et fonctionnels d'autre part.

Donc, la technique de Lacy et Kostianovsky est très efficace pour la purification d'îlots de sujets normaux. Cependant, elle est limitée ainsi que toutes les autres techniques lorsqu'il s'agit d'entreprendre la purification d'îlots de pancréas de sujets diabétiques. Après plusieurs tentatives infructueuses, nous avons décidé de modifier la technique en partant du principe que la taille des îlots, du fait de la perte des cellules bêta au cours du diabète, était considérablement réduite. L'article 1 décrit en détail les modifications apportées à la technique. Le rendement des îlots diabétiques ainsi obtenu est acceptable même s'il reste de moitié inférieur à celui des îlots normaux (300 ± 100). La taille des îlots étant le facteur limitant de la réussite de

la technique. Cependant, ce rendement s'est montré juste suffisant pour mener à bien nos objectifs. Il nous a permis d'obtenir des images de qualité démontrant la morphologie des îlots, qui apparaissent très bien délimités, arrondis malgré leur très petite taille (1/10 des îlots normaux) et des quantités d'ARN totaux suffisantes pour quantifier l'expression du messager de la somatostatine par la technique semi-quantitative de RT-PCR.

Les différents résultats obtenus à partir d'îlots purifiés et présentés dans les articles 1, 2, 3 et 4 de cette thèse illustrent très bien la réussite de la technique autant d'un point de vue quantitatif que qualitatif. Elle nous a permis essentiellement d'atteindre le premier de nos objectifs qui était de démontrer les changements métaboliques de la somatostatine au cours du diabète et suite à un traitement à l'insuline, par les deux méthodes de RT-PCR et microscopie confocale principalement.

Les paragraphes suivants vont rappeler les grandes lignes des différents résultats obtenus quant aux effets de l'insuline sur le métabolisme de la SS *in vivo*, à partir d'îlots purifiés de rats (article 3) et *in vitro*, à partir d'îlots purifiés de rat et des cellules RIN-14B à SS (articles 3 et 4) afin de pouvoir discuter des conséquences de ces changements métaboliques sur la physiologie pancréatique endocrine.

2- Changements métaboliques de la somatostatine observés au cours du diabète, d'un traitement à l'insuline et suite à l'arrêt de ce traitement

Afin de justifier nos résultats sur les changements métaboliques de la somatostatine observés au cours de notre protocole expérimental, nous avons dû

vérifier certains paramètres biochimiques telless la glycémie et la triglycérémie connues pour être altérées dans ce cas là. Dans l'introduction, nous avons présenté les effets de l'insuline sur le métabolisme glucidique et lipidique. Ainsi, l'insuline est la seule hormone hypoglycémiante connue à ce jour. Brièvement, elle agit en favorisant le transport du glucose depuis le compartiment sanguin jusqu'au cytoplasme cellulaire via la translocation des transporteurs du glucose GLUT à la membrane plasmique dans la plupart des cellules et en stimulant la glycogénèse et en inhibant la glycogénolyse dans les hépatocytes et les cellules musculaires. Elle influe aussi sur le métabolisme lipidique en favorisant l'entrée des graisses dans les tissus périphériques et les cellules adipocytaires où elles sont utilisées comme source d'énergie et pour la biosynthèse des acides gras respectivement. Ainsi l'insuline contribue au maintien d'une glycémie et d'une triglycérémie plasmatique constante.

Des études ont démontré l'efficacité de la streptozotocine à pouvoir induire un diabète (Islas-Andrade, 2000; Szkudelski, 2001). Cependant, dans notre étude présentée dans l'article 3, nous avons jugé préférable de vérifier l'établissement du diabète et sa stabilité dans le temps par des tests très simples mais efficaces. Nous avons prélevé le sang dans la veine cave inférieure de chacun des rats sacrifiés pour effectuer le dosage de la glycémie et de la triglycérémie plasmatique. Ainsi, l'augmentation des taux de glucose et de triglycérides et leur maintien à des valeurs supra physiologiques démontrent que la streptozotocine à effectivement induit un diabète et que celui-ci se maintient au moins pendant 28 jours. La perte de poids observée entre 7 et 28 jours corrèle avec le taux élevé de triglycérémie suggérant une lipolyse accrue du tissu adipeux.

Au cours du développement du diabète, nous avons observé par la technique de RT-PCR que l'expression du messager de la SS dans les îlots augmentait de quatre fois comparativement à celle des îlots non diabétiques. Ces résultats sont comparables à ceux observés à partir de pancréas total de rats diabétiques et non diabétiques. Nos résultats sont en accord avec l'étude de Papachristou qui avait démontré par Northern Blot que l'expression de la SS de pancréas de rats rendus diabétiques par la streptozotocine était très largement augmentée par rapport à celle de pancréas de rats contrôles (Papachristou et al., 1989). De plus, l'augmentation de l'expression du gène de la SS observée au cours du développement du diabète est corrélée avec une augmentation des contenus de l'hormone. Ceci a été observé par Patel à partir d'îlots purifiés de rats normaux et rendus diabétiques par la streptozotocine ainsi que par Orci à partir de pancréas de cadavres humains atteints de diabète de type I ou sains (Patel et al., 1978; Orci et al., 1976). Chez les sujets diabétiques, les contenus en SS étaient supérieurs à ceux des sujets non diabétiques.

Afin de déterminer si la carence en insuline induite par la streptozotocine et responsable de l'état diabétique des rats était à l'origine de ces changements dans le métabolisme de la cellule delta, nous avons traité quotidiennement aux 12 heures un groupe de rats diabétiques de 7 à 21 jours. Nous avons observé que l'administration d'insuline exogène rétablissait la glycémie et la triglycémie et permettait aux rats de recouvrer un poids corporel normal comparativement aux rats contrôles, démontrant ainsi l'efficacité de notre traitement. Ce traitement a eu pour effet de rétablir l'expression de la SS comparablement à celle observée chez les animaux non diabétiques dès 7 jours de traitement. La prolongation du traitement sur 21 jours a

maintenu cette expression. Une seule étude à ce jour avait mis en évidence avant nous que l'expression de la SS pancréatique de rat pouvait redevenir normale suite à un traitement à l'insuline. Toutefois, cette étude a été effectuée à partir de pancréas total et par la technique de Northern Blot (Papachristou et al, 1989). Dans notre étude, nous avons observé l'expression de la SS par RT-PCR à partir de pancréas total et confirmé nos résultats à partir d'îlots purifiés, exhaustivement détaillés dans l'article 3.

L'arrêt du traitement à l'insuline pendant 21 jours a de nouveau induit une hyperglycémie comparable à celle survenue lors de l'induction du diabète par la streptozotocine. Par contre, la triglycémie est restée à un niveau normal suggérant un métabolisme des acides gras dans une voie autre que celle de la lipogénèse des adipocytes. En effet la lipoprotéine lipase qui permet l'entrée des acides gras dans les adipocytes est insulino-dépendante, elle n'est donc pas opérationnelle lors d'un arrêt du traitement à l'insuline sur des sujets diabétiques. Par contre, le foie peut utiliser une partie des graisses pour la synthèse de corps cétoniques ce qui pourrait expliquer une triglycémie normale. Nous avons aussi observé que l'expression de la somatostatine revenait à un niveau élevé comparable à celui observé au cours du diabète. Nous sommes les seuls à ce jour à avoir effectué cette expérience, détaillée dans l'article 3.

Nous avons poursuivi notre étude en démontrant que ces effets de l'insuline sur le métabolisme de la SS, observés *in vivo* étaient les mêmes *in vitro* (article 4). D'une part nous avons démontré que l'insuline inhibait l'expression du message de la SS dans des îlots purifiés de rats normaux ou diabétiques mis en culture

comparativement aux mêmes types d'îlots non incubés avec l'hormone. D'autre part nous avons confirmé que sur les cellules RIN-14B, l'insuline exerçait un effet inhibiteur sur le contrôle de l'expression du messenger de la SS, et nous sommes les premiers à avoir démontré que cet effet était à la fois dépendant de la concentration et du temps d'incubation de l'insuline. De plus, cet effet est totalement indépendant de la concentration de glucose et requiert la synthèse *de novo* d'un ou plusieurs facteurs protéiques. L'inhibition de l'expression de la SS par l'insuline corrèle avec une inhibition de la synthèse de la SS.

L'ensemble de ces résultats démontre que l'insuline joue un rôle dans le contrôle du métabolisme de la SS pancréatique, à savoir l'inhibition de l'expression de son gène et sa synthèse protéique. Une carence en insuline dans le cas du diabète, entraîne donc une augmentation de l'expression du gène et des contenus de la SS. Quels peuvent donc être les effets biologiques et les conséquences de tels changements du métabolisme de la SS pancréatique au niveau local (l'îlot de Langerhans) sous les conditions physiologiques et au cours du diabète?

3- Effets biologiques potentiels du contrôle de la SS pancréatique par l'insuline sur le pancréas endocrine.

*** Sous conditions physiologiques**

Afin de bien comprendre les implications biologiques du contrôle de l'insuline sur l'expression, la synthèse et la sécrétion de la SS, il est essentiel de rappeler que les hormones pancréatiques interagissent entre elles au sein de l'îlot de façon paracrine. La cellule bêta du pancréas endocrine est l'unique source d'insuline de l'organisme

même si des études ont démontré l'existence de cellules extra-pancréatiques capables de produire de la proinsuline (Brimnes MK et al., 2002; Kojima et al., 2004). Les effets biologiques de l'insuline au niveau de l'organisme ont été détaillés dans l'introduction de cette thèse. De nombreuses études ont montré que le glucagon stimulait la sécrétion de l'insuline autant chez l'humain (Bjork et al., 1998) que chez le rat (Jarrousse et al., 1984; Saudek et al., 1999) ou le porc (Bertuzzi et al., 1995). A l'inverse, l'insuline inhibe la sécrétion de glucagon chez l'humain (Waeber et al., 1997) et chez le rat (Maruyama et al., 1984). Le glucagon est connu pour stimuler la sécrétion de SS chez le rat (Murakami et al., 1982), chez la truite arc-en-ciel (Eilertson et al., 1995). Le rôle de l'insuline sur la sécrétion de SS pancréatique est quant à lui controversé, nous l'avons exhaustivement détaillé dans l'introduction de cette thèse. Enfin, il est bien reconnu aujourd'hui que la SS inhibe la sécrétion des hormones insuline et glucagon, mais n'a aucun effet sur la libération du polypeptide pancréatique (Kleinman et al., 1995). Plusieurs études sont d'accord pour stipuler que la SS-14 pancréatique contrôlerait l'inhibition du glucagon chez le rat *via* une action locale (Cejvan et al., 2003), il en serait de même chez la souris (Strowski et al., 2000). Par contre, l'inhibition de l'insuline serait préférentiellement contrôlée par la SS-28 intestinale chez le babouin (Ensinck JW et al., 1997), chez le rat (Brown M et al., 1981; Amherdt et al., 1987; Schuit et al., 1989), chez l'humain (Klauff et al., 1983; D'Alessio et al., 1989) et chez le hamster (Reubi et al., 1982) ceci s'expliquant par la présence sur les cellules bêta du SST-5 ayant une haute affinité pour la SS-28 (Strowski et al., 2000 et 2003). De plus, des études ont démontré que seule la SS-28 était retrouvée dans la circulation périphérique suite à une prise alimentaire chez

l'homme (Ensinck et al., 1989 et 1990). Ces dernières études suggèrent donc que la SS-14, forme majoritaire de SS dans le pancréas, n'ait presque pas de rôle dans la physiologie endocrine de l'insuline. Ceci a été expliqué par Bonner-Weir et Orci qui ont démontré que le corps central des îlots de Langerhans formé par les cellules bêta était perfusé de manière centrifuge rendant leur accès impossible pour la SS-14 libérée par les cellules delta périphériques (Bonner-Weir et Orci, 1982). Cette étude a été confirmée plus tard par Samols et Stagnier, 1991. Par contre, la sécrétion paracrine d'insuline a pour cible les cellules delta pancréatiques. Dans le milieu interstitiel de l'îlot, les concentrations d'insuline peuvent être très élevées allant jusqu'à 100 nM (Bonner-Weir et Orci, 1982) et justifiant ainsi l'utilisation de cette concentration dans notre étude in vitro sur les cellules RIN-14B et les îlots purifiés.

Même si de nombreux effets biologiques principalement inhibiteurs ont été attribués à la SS et détaillés dans l'introduction de cette thèse, aucun d'entre eux n'a été attribué à la SS pancréatique spécifiquement, hormis pour l'inhibition de la sécrétion du glucagon.

Donc, à la lumière de l'ensemble de ces résultats, dans des conditions physiologiques, la libération de SS pancréatique aurait pour cible les cellules alpha à glucagon qui possèdent le SST-2 ayant une haute affinité pour la SS-14, forme principale de SS dans le pancréas (Strowski et al., 2000, Cejvan et al., 2003). La mise en évidence de l'action de la cellule delta sur la cellule alpha pourrait aussi expliquer les dérégulations métaboliques des hormones pancréatiques survenant au cours du diabète.

** Au cours du diabète*

Nous avons exhaustivement détaillé les résultats que nous avons obtenus sur l'expression du gène de la SS et de sa synthèse qui sont significativement augmentées au cours du diabète expérimental induit par la streptozotocine (Article 3 et 4). Cependant nous n'avons pas pu démontrer si la sécrétion était altérée au cours du diabète puisque le niveau de SS libérée n'était pas détectable probablement du fait de l'effet inhibiteur de 94 % de l'insuline sur les contenus en SS des cellules RIN-14B. Par contre, il est évident que les anomalies métaboliques de la SS au cours du diabète sont une conséquence directe d'une déficience en insuline puisqu'un traitement avec l'hormone restaure la physiologie de la cellule delta et qu'un arrêt du traitement au contraire induit les mêmes anomalies observées au cours du diabète initial. Nous avons démontré que ces effets étaient indépendants de la glycémie (article 4). Ainsi, la physiologie de la cellule delta pancréatique semble directement reliée à la physiologie de la cellule bêta au cours du diabète. Mais il n'est pas exclu que ce contrôle puisse également exister dans les conditions physiologiques même s'il est peu probable étant donné le temps requis pour aboutir à de tels changements. En effet, dans les conditions physiologiques, la relâche d'insuline est transitoire et rythmée en dehors des repas tandis qu'au cours du diabète l'état d'insuffisance est permanent.

Si l'effet de la cellule bêta sur la cellule delta semble bien établi à la lumière de tous ces résultats, il est également possible d'envisager une étroite relation réciproque entre la cellule delta et la cellule alpha. En effet, nous venons d'expliquer les conséquences du diabète sur la physiologie de la cellule delta. Il est évident que ces changements vont perturber des cellules cibles de la SS pancréatique que sont les

cellules alpha à glucagon (Strowski et al., 2000, Cejvan et al., 2003). Au cours du diabète, des études ont démontré une hyperglucagonémie soit une augmentation du taux plasmatique de glucagon due à une hypersécrétion du glucagon chez le rat (Weir et al., 1976, Patel et al., 1978), une augmentation du nombre des cellules alpha dans les îlots diabétiques humains et de rats (Orci et al., 1976, Patel et al., 1978) et une augmentation des contenus en glucagon des cellules alpha (Patel et al., 1978). Le glucagon sous conditions physiologiques est libéré lorsque la glycémie baisse généralement en état de jeûne ou de stress et agit essentiellement au niveau du foie où il stimule la glycogénolyse et la néoglucogénèse (Jiang et Zhang, 2003). Suite à un repas, l'insulinémie augmente et la glucagonémie diminue. Par contre, au cours du diabète, la libération de l'insuline est retardée ou inefficace mais celle du glucagon ne diminue pas au contraire, générant l'hyperglucagonémie largement responsable de l'hyperglycémie (Dinneen et al., 1995). Nous avons vu que la SS inhibe la sécrétion de glucagon. Dans le cas du diabète, nous avons observé une augmentation importante de l'expression et des contenus de la SS pancréatique suggérant vraisemblablement une augmentation de la sécrétion de l'hormone. Des études supportent notre hypothèse puisqu'elles ont démontré une augmentation de la SS plasmatique périphérique au cours du diabète induit par la streptozotocine chez le singe (Jones et al., 1995), chez l'humain atteint de diabète juvénile (Skare et al., 1985; Beylot et al., 1986; Domschke et al., 1988) ou chez le rat (Ariznavarreta et al., 1987). Une autre étude a également montré que la sécrétion de SS pancréatique augmentait à partir de pancréas diabétique isolé mis en culture (Kadowaki et al., 1980). Des études ont également démontré une hyperplasie des cellules delta 6 mois après l'induction du

diabète par la streptozotocine chez le rat (Orci et al, 1976; Makino et al., 1977; Matsushima et al., 1978; Papachristou et al., 1989). Tous ces résultats suggèrent fortement une conséquence probable d'un effet compensatoire des cellules delta pour inhiber la sécrétion de glucagon localement. Mais il est évident que seule, la SS pancréatique ne suffit pas à expliquer ce phénomène, mais tout au moins peut y contribuer localement au niveau de l'îlot.

** Au cours du développement pancréatique*

Au cours du développement fœtal pancréatique, des travaux effectués chez l'humain ont démontré que l'expression de la SS et la densité des cellules delta étaient élevées par rapport aux autres types cellulaires. C'est seulement à la naissance que la densité des cellules bêta augmentent pour occuper 80% de l'îlot et que donc proportionnellement la densité des cellules delta diminue pour ne représenter que 3% du volume de l'îlot (Clark and Grant, 1983; Stefan et al. 1983, Rahier et al., 1980; Bocian-Sobkowska et al. 1997). Cette situation est curieusement semblable à celle observée au cours du diabète où certains auteurs ont décrit une hyperplasie des cellules delta pancréatiques (Orci et al, 1976; Makino et al., 1977; Matsushima et al., 1978; Papachristou et al., 1989). Dans les deux cas, l'absence d'insuline semble favoriser le métabolisme de la cellule delta. Ceci n'est bien évidemment qu'une observation de notre part mais elle suggère cependant un effet direct de l'insuline sur le contrôle négatif de la physiologie pancréatique de la SS.

Toutes ces données démontrent la complexité de la physiologie du pancréas endocrine qui fait aujourd'hui l'objet de nombreuses études intensives afin de comprendre les mécanismes hormonaux intrinsèques à la fois dans les conditions

physiologiques et pathologiques comme le diabète dont la prévalence augmente de façon inquiétante. A la lumière de l'ensemble des résultats décrits dans la littérature et des nôtres présentés dans cette thèse, il est évident que le rôle de la SS pancréatique est encore mal compris. Beaucoup de spéculations et d'hypothèses sont proposées mais tant que les études vont demeurer contradictoires quant aux changements observés au cours du diabète, il sera toujours très difficile d'établir un consensus.

Au cours de notre recherche nous nous sommes efforcés de comparer le plus objectivement possible nos études effectuées *in vivo* et *une vitro* à partir de deux modèles expérimentaux différents. Nous venons de discuter ces résultats en tenant compte d'autres études comme références afin de comprendre les conséquences biologiques des changements métaboliques de la SS au cours du diabète.

Si les études présentées précédemment ont toujours eu pour objectif de mettre en évidence les changements métaboliques de la SS au cours du diabète et d'y suggérer l'effet de l'insuline, aucune d'entre elles n'a eu pour objectif de proposer les mécanismes intracellulaires à l'origine de ces effets.

Notre deuxième objectif était donc de mettre en évidence une voie de signalisation via laquelle l'insuline pourrait médier son effet inhibiteur sur l'expression du messenger de la somatostatine. Pour atteindre cet objectif, les îlots de Langerhans ne sont pas un bon modèle d'étude dans le sens où ils regroupent un ensemble d'au moins quatre types cellulaires tous capables de répondre à l'insuline endogène et exogène. De plus la proportion des cellules delta étant très faible dans

l'îlot, environ 3%, il est difficile d'envisager une isolation de ces cellules pour en faire une culture primaire (Ulrich et al., 2002). Nous avons donc choisi une lignée cellulaire produisant et sécrétant la somatostatine (Bhathena et al., 1984) pour compléter notre étude sur les effets de l'insuline sur le métabolisme de la SS pancréatique. Avant de commencer l'étude proprement dite de la signalisation cellulaire, nous nous sommes assurés de la présence de l'un des éléments essentiels pour l'accomplissement de la transduction du signal insulinique, à savoir un récepteur de l'insuline. Les cellules RIN-14B expriment le récepteur à l'insuline de type IGF-1, tout comme les îlots de Langerhans de rat (article 3). L'insuline, l'IGF-1 et l'IGF-2 peuvent transduire leur signal via le récepteur à l'IGF-1. En effet, aux concentrations choisies et utilisées de l'ordre du nM au μ M, l'insuline peut médier ses effets *via* ce récepteur (Blakesley et al., 1999).

4- Expériences préliminaires sur l'étude d'une voie AMPc-dépendante de l'insuline sur le contrôle de l'expression de la somatostatine pancréatique

Nous avons précisément détaillé dans l'introduction de cette thèse que l'élément de réponse à l'AMPc (CRE) présent dans le promoteur du gène de la SS était essentiel pour la transactivation du gène de la SS. Les hormones comme le glucagon, la GIP (Gastric-Inhibitory Peptide), le VIP (Vasoactive Intestinal Peptide) ou encore la sécrétine sont connues pour induire une augmentation du taux d'AMPc intracellulaire via leur liaison à des récepteurs couplés aux protéines G et à l'origine de l'activation d'une adénylate cyclase (Patton et al., 1977; Ipp et al., 1978; Samols et al., 1979). Des études ont démontré que ces hormones pouvaient induire la sécrétion

de somatostatine gastrique (Robbins et al., 1982) ou hypothalamique (Chiba et al., 1978). Nous avons vu en introduction que la transactivation du gène de la SS implique une augmentation intracellulaire du taux d'AMPC responsable de l'activation de la protéine kinase A cytoplasmique et de la dissociation des ses deux sous-unités catalytiques avec les sous unités régulatrices. Les sous unités catalytiques transloquent dans le noyau pour phosphoryler le facteur de transcription CREB. Phospho-CREB lie alors son élément CRE sur le promoteur avec l'aide d'un co-facteur et le gène de la SS est alors transactivé (Montminy et al., 1986; Zhu et al., 1989; Kwok et al., 1994).

De plus, comme nous l'avons décrit dans l'introduction, certaines études antérieures et plus récentes ont très bien démontré le couplage entre des récepteurs à activité tyrosine kinase et des protéines G capables de provoquer des effets biologiques *via* une voie AMPC-dépendante (O'Brien et al., 1987; Pertseva et al., 1995; Sanchez-Margalet et al., 1999; Pertseva et al., 2003; Kreuzer et al., 2004).

A la lumière de tous ces résultats, il nous a été possible d'envisager objectivement que l'insuline pourrait contrôler la transactivation du gène de la SS *via* une voie AMPC-dépendante impliquant le couplage de son récepteur avec une protéine Gi. L'hypothèse de l'implication d'une protéine Gi étant la plus probable étant donné que l'insuline dans notre cas médie un effet négatif.

Cependant, les deux voies principales par lesquelles l'insuline transduit ses effets sont les voies de la PI-3Kinase et des MAP Kinases (Saltiel and Kahn, 2001; Saltiel and Pessin, 2002; Kirwan and del Aguila, 2003). Nous avons donc également étudié ces deux voies en regard de l'effet de l'insuline sur l'expression de la SS.

Nos premiers résultats présentés dans l'article 4 suggèrent qu'au moins deux des trois voies de signalisation de l'insuline citées précédemment soient impliquées dans l'inhibition de la transactivation du gène de la SS pancréatique. En effet, le blocage spécifique de MEK par le UO126 a totalement empêché la médiation de l'effet inhibiteur de l'insuline sur l'expression du gène de la SS pancréatique; par contre, le blocage de la voie PI-3Kinase par le LY294002 n'a empêché que partiellement cet effet négatif. Ceci suppose donc une implication prépondérante de la voie MAP Kinase. Dans le but de vérifier si la voie mettant en jeu le couplage d'une protéine Gi avec le récepteur de l'insuline était réellement impliquée, nous avons commencé notre recherche en inhibant l'activité de la protéine Gi par la toxine pertussique connue pour inhiber son activité d'une part et nous avons amplifié la voie AMPc-dépendante par un analogue pharmacologique de l'AMPc, le Br-AMPc d'autre part. Nos résultats suggèrent effectivement l'implication d'une protéine Gi puisque son inhibition en présence d'insuline résulte en une augmentation significative de l'expression du message de la SS, suggérant ainsi l'incapacité de l'insuline de médier son effet inhibiteur sur le gène de la SS autrement que par l'activation d'une protéine Gi. Nous avons obtenu ces résultats alors que les cellules RIN-14B avaient été en présence pendant 2 heures avec la toxine pertussique préalablement activée par 2 mM DTT et 2 mM ATP, avant l'ajout de l'insuline pendant 4 heures. Les mêmes résultats ont été obtenus lorsque les cellules avaient été préincubées 16 heures avec la toxine pertussique non activée par le DTT et l'ATP avant l'ajout de l'insuline (résultats non présentés dans l'article 4). L'effet du Br-AMPc en présence d'insuline est au départ surprenant. En effet, nous nous serions logiquement attendus à une augmentation de

l'expression de la SS puisque la voie AMPc dépendante est soutenue en présence du Br-AMPc malgré la présence de l'insuline. Cependant, la concentration utilisée du Br-AMPc, 1 μ M n'est peut-être pas suffisante. Même si cette concentration augmente la transactivation basale des cellules RIN-14B, elle n'est peut-être pas suffisante pour contrecarrer l'effet inhibiteur de l'insuline utilisée à 100nM. Mais ces résultats peuvent aussi suggérer l'implication de phosphodiésterases connues pour catalyser la réaction inverse de l'adénylate cyclase, soit une hydrolyse de l'AMPc, aboutissant ainsi à une diminution de son niveau intracellulaire. Des études ont en effet démontré l'effet de l'insuline sur l'augmentation de l'activité des phosphodiésterases (PDE) chez le rat (Kitamura et al., 1999, Hasegawa M et al., 2002) pouvant être médié par la voie MAPKinase (MacKenzie et al., 2000).

Ces résultats encore préliminaires ouvrent cependant de grandes portes quant à la régulation du gène de la SS pancréatique par l'insuline, mettant clairement en évidence un effet paracrine de la cellule bêta sur la cellule delta. Ceci est très important pour la compréhension de la physiologie du pancréas endocrine et de la cellule delta autant sous conditions physiologiques que pathologiques. En effet, mettre en évidence des effets biologiques est important, mais comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels ils apparaissent l'est encore plus dans le but de mettre au point des traitements thérapeutiques ciblant spécifiquement une molécule.

V- CONCLUSIONS

Des résultats contradictoires quant aux changements métaboliques de la SS pancréatique observés au cours du diabète et d'autres sur les effets de l'insuline sur la physiologie sécrétrice de la SS ont été à la base de notre recherche. En effet, certains auteurs ont démontré des augmentations de l'expression et des contenus de la somatostatine associées à une hypertrophie et une hyperplasie des cellules delta pancréatiques au cours du diabète (Patel et al., 1976; Orci et al., 1976; Makino et al., 1977; Patel et al., 1978; Matsushima et al., 1978; Papachristou et al., 1989) alors que d'autres au contraire ont démontré que l'expression et les contenus en somatostatine pancréatique diminuaient chez des animaux spontanément diabétiques, les souris ob/ob et db/db (Patel et al., 1976; Patel et al., 1977). De plus, dans certains cas l'insuline stimulait la sécrétion de somatostatine pancréatique (Honey and Weir, 1979; Eilertson et al., 1995) ou l'inhibait (McEvoy, 1981; Rouiller et al., 1981; Gerber et al., 1981; Murakami et al., 1982; Schaffer et al., 1985; Ribes et al., 1988) ou encore, n'a pas eu d'effet (Patton et al., 1977; Weir, 1979; Patel et al., 1979). Finalement, aucun mécanisme moléculaire n'a jamais été mis en évidence pour expliquer le rôle de l'insuline sur le contrôle de l'expression de la SS.

Nos objectifs étaient 1) de déterminer les changements métaboliques de la somatostatine pancréatique au cours du diabète et suite à une insulinothérapie puis 2) d'identifier la/les voie(s) de signalisation(s) empruntée(s) par l'insuline pour expliquer les effets observés.

L'ensemble de nos résultats démontre que nous avons répondu au premier objectif. En effet, nous avons déterminé les changements métaboliques de la SS *in vivo* au cours du diabète, lors d'un traitement à l'insuline et suite à un arrêt de ce traitement à partir d'études effectuées sur le pancréas total mais aussi à partir des îlots purifiés normaux et diabétiques, après nous être assurés qu'ils représentaient un bon modèle d'étude. Nous avons observé dans cette étude *in vivo* que :

1. L'expression du messenger et les contenus de la SS pancréatique augmentaient au cours du diabète induit par la streptozotocine.
2. Un traitement à l'insuline rétablissait l'expression du messenger et les contenus de la SS aux niveaux observés chez les animaux contrôles.
3. Un arrêt du traitement à l'insuline induisait les mêmes changements sur l'expression et les contenus de la SS que ceux observés lors de l'induction du diabète initial.

Nous avons confirmé une partie de ces résultats *in vitro* d'une part à partir d'îlots purifiés de rats normaux et diabétiques et nous avons complété l'étude en utilisant une lignée de cellules endocrines à SS d'autre part, après nous être assurés qu'elles représentaient un bon modèle d'étude en démontrant que :

4. L'insuline exogène exerçait un effet négatif sur l'expression du messenger de la SS dans les cellules delta d'îlots normaux et diabétiques.
5. L'effet inhibiteur de l'insuline sur l'expression du gène de la SS pancréatique était dépendant à la fois de la concentration de l'insuline et du temps d'exposition des cellules RIN-14B à l'hormone.

6. L'effet inhibiteur de l'insuline sur l'expression du gène de la SS était totalement indépendant de la concentration de glucose présente dans le milieu de culture des cellules RIN-14B.
7. L'insuline exerçait un effet négatif sur les contenus en SS des cellules RIN-14B tout comme celui observé *in vivo* dans des pancréas totaux.

Notre deuxième objectif était d'identifier une voie de signalisation et/ou certains des mécanismes moléculaires impliqués dans le signal insulinique à l'origine des changements métaboliques de la SS. Nos résultats obtenus à partir d'expériences effectuées *in vitro* sur les cellules RIN-14B ont démontré que :

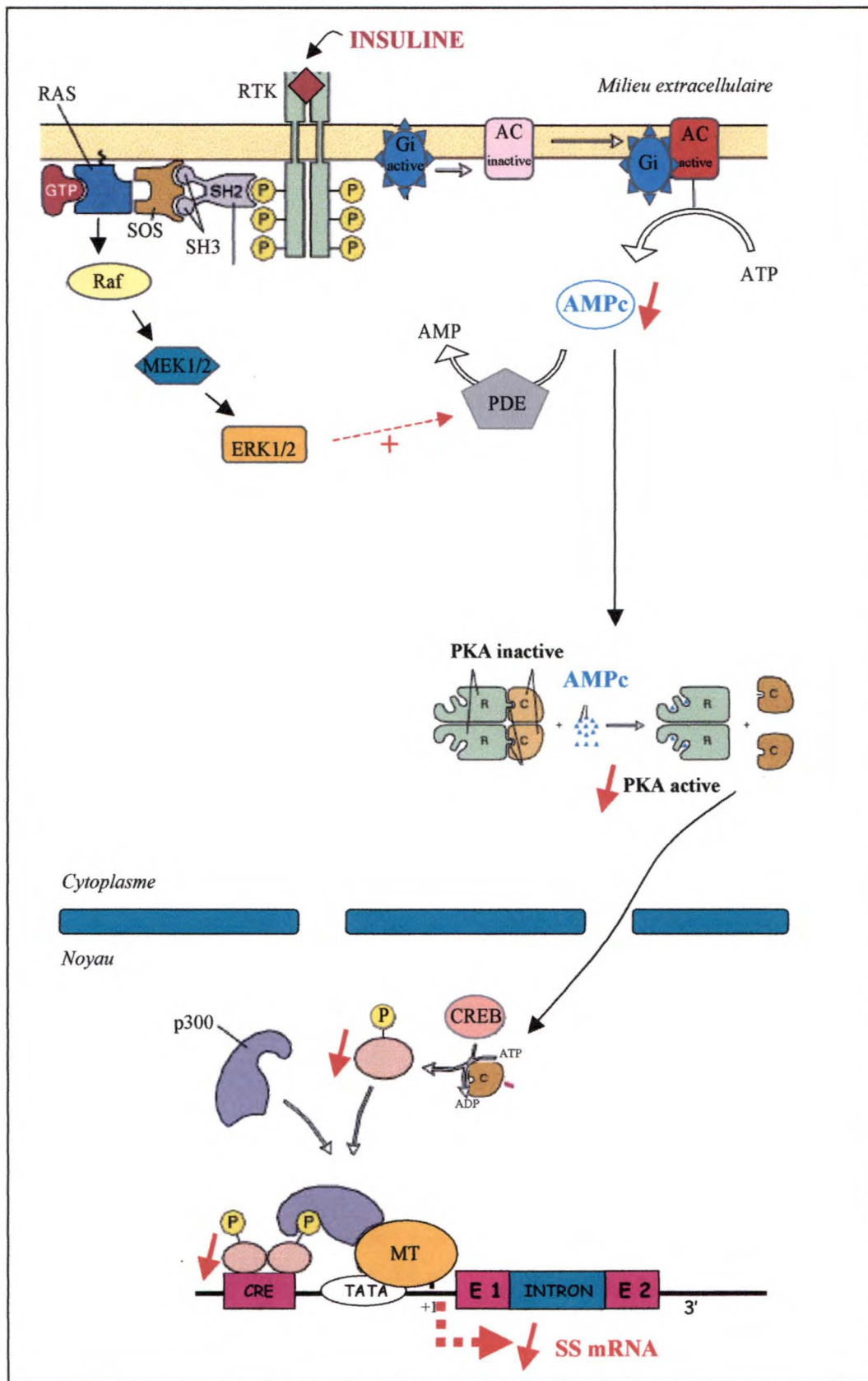
1. L'effet négatif de l'insuline sur l'expression de la SS des cellules RIN-14B nécessitait la synthèse *de novo* d'au moins un facteur protéique.
2. Le signal insulinique emprunterait deux voies de signalisation séparées : la voie AMPc dépendante via une protéine Gi d'une part et une la voie MAP Kinase d'autre part. Toutes deux agiraient en synergie pour aboutir à la modulation de l'expression du gène de la SS.

Évidemment, nous avons encore très peu d'éléments pour caractériser en détail la voie insulinique menant à une diminution de l'expression du gène de la SS pancréatique mais ils nous permettent de suggérer un schéma hypothétique des voies AMPc-dépendante et MAPKinase empruntées par l'insuline pour contrôler négativement la transactivation du gène de la somatostatine présentée dans la figure 11.

L'ensemble de cette étude a répondu en grande partie aux objectifs que nous nous étions fixés. Elle présente un grand intérêt dans le sens que contrairement à plusieurs résultats contradictoires quant au rôle de l'insuline sur la physiologie endocrine de la somatostatine pancréatique, nous avons réussi à démontrer des effets identiques en effectuant des études aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* sur des îlots de même que sur des cellules en culture. De plus, nos derniers résultats même s'ils sont encore préliminaires sont les seuls à ce jour à avoir mis en évidence une voie de signalisation probable expliquant les effets de l'insuline sur l'expression de la SS pancréatique.

Cependant, ces études sont préliminaires et elles mettent en évidence la complexité des mécanismes impliqués à la fois sous conditions physiologiques et pathologiques. De nombreuses questions restent sans réponse et les perspectives sont nombreuses pour réussir à dresser un schéma précis de l'effet insulinique sur la physiologie pancréatique de la SS.

Figure 11. Modèle hypothétique de la voie insulinique sur le contrôle de l'expression du gène de la SS pancréatique. L'insuline activerait son récepteur à activité tyrosine kinase (RTK). Le couplage du RTK avec une protéine Gi résulterait en l'inhibition de l'activité de l'enzyme adénylate cyclase (AC) provoquant une diminution du taux d'AMPc. Parallèlement, l'insuline *via* l'activation de la voie MAP Kinase pourrait activer une phosphodiesterase (PDE) par ERK1/2, menant également à une diminution du taux d'AMPc. Ceci résulterait en la diminution de l'activation de la protéine kinase AMPc dépendante (PKA). Ainsi peu de sous-unité catalytiques (C) transloqueraient au noyau pour phosphoryler CREB (protéine de liaison de l'élément de réponse à l'AMPc, CRE). Une diminution du taux de phopho-CREB entraînerait une diminution de transactivation du gène de la SS pancréatique (SS mRNA) des cellules delta ou des cellules RIN-14B par le complexe de la machinerie transcriptionnelle (MT).



VI- PERSPECTIVES

Afin d'optimiser les résultats obtenus à partir des cellules RIN-14B, il serait intéressant de refaire l'étude *in vitro* à partir d'îlots purifiés. Il est également indispensable de poursuivre l'étude de la voie de signalisation insulinique. Plus en détails, il faudrait :

1- Etudier *in vitro* l'effet de l'insuline sur la physiologie de la cellule delta à partir d'îlots purifiés normaux et diabétiques afin de :

- Démontrer l'effet négatif de l'insuline en rapport avec des variations de temps et de concentration sur l'expression de la SS.
- Démontrer l'effet inhibiteur de l'insuline sur l'expression de la SS quelle que soit la concentration de glucose présente dans le milieu de culture.
- Démontrer l'effet inhibiteur de l'insuline sur les contenus en SS des îlots en culture sur une période de 48 heures.
- Démontrer l'effet stimulateur de l'insuline sur la sécrétion de SS des îlots en culture.

2- Approfondir l'étude de la voie AMPc-dépendante impliquant le couplage d'une protéine Gi avec le récepteur tyrosine kinase de l'insuline dans les cellules RIN-14B.

Pour ce faire, il faudrait explorer plusieurs étapes de la voie de signalisation suggérée à la figure 11 par l'utilisation d'agents inhibiteurs ou

stimulateurs des principaux effecteurs de la voie AMPc dépendante afin de déterminer leur rôle ou par le dosage de l'activité de certaines enzymes impliquées dans cette voie.

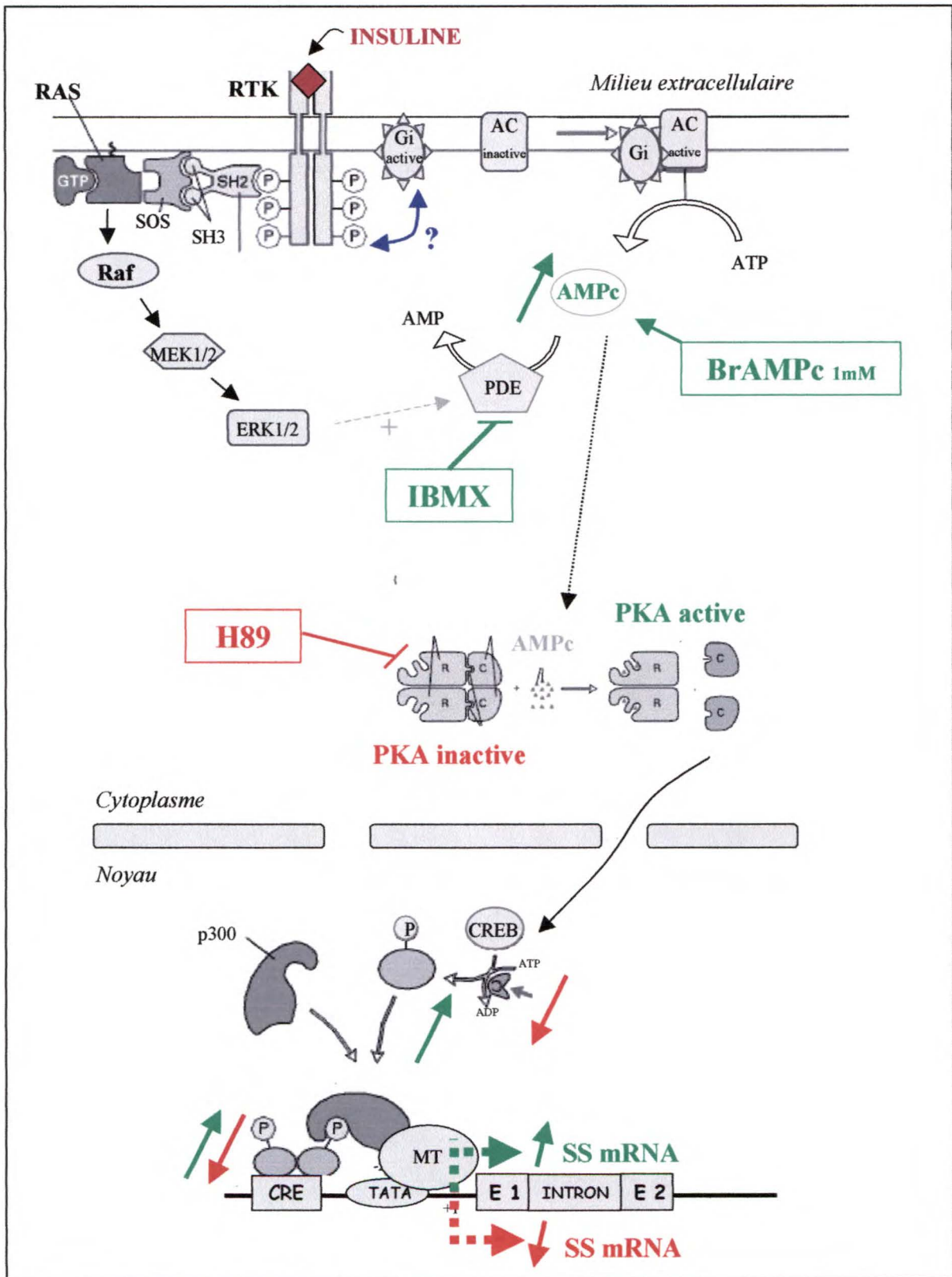
Ainsi, l'utilisation d'un inhibiteur de la protéine kinase A, le H89 permettrait de mettre en évidence son implication en aval de l'activation de la protéine Gi et en amont de la phosphorylation de CREB. Le blocage de la voie AMPc dépendante sous ces conditions, même en présence d'insuline, devrait résulter en une diminution de l'expression de la SS comparativement au contrôle (Figure 12).

L'amplification de la voie AMPc-dépendante par le Br-AMPc à des concentrations de l'ordre du mM d'une part ou par le forskolin (50 μ M) d'autre part devraient au contraire contrecarrer l'effet inhibiteur de l'insuline sur l'expression du messenger de la SS. L'ajout d'inhibiteurs de phosphodiésterases comme l'IBMX devrait confirmer la mise en jeu de la voie AMPc-dépendante d'une part, et supporter notre hypothèse que la voie MAP Kinase serait impliquée dans l'activation de ces enzymes (Figure 12).

Le dosage des activités des enzymes adénylate cyclase et phosphodiésterases dans les mêmes conditions de stimulation en présence de 100 nM insuline durant 4 h est également envisageable. Ceci nécessiterait cependant la mise au point des techniques dans notre laboratoire car nous n'avons jamais effectué de tels protocoles. Certaines études ont cependant détaillé le protocole et pourraient servir de référence (Rahn et al., 1996 ; Kitamura et al., 1999).

L'immunoprécipitation de la protéine Gi avec l'IRS ou le récepteur tyrosine kinase à partir de membranes purifiées de cellules RIN-14B confirmerait leur couplage suite à l'activation du récepteur par l'insuline (Figure 12, flèche bleue).

Figure 12. Perspectives pour l'étude de la voie insulinique sur le contrôle de l'expression du gène de la SS pancréatique. L'utilisation d'un inhibiteur de la PKA, le H89, provoquerait une diminution du taux de phosphorylation de CREB, et même en présence d'insuline, ceci devrait résulter en une diminution de l'expression de la SS (texte et flèches rouges). L'amplification de la voie AMPc-dépendante par le Br-AMPc normalement non hydrolysable à des concentrations de l'ordre du mM devrait au contraire contrecarrer l'effet inhibiteur de l'insuline sur l'expression du messenger de la SS. L'ajout d'inhibiteurs de phosphodiesterases comme l'IBMX devraient aussi provoquer une augmentation du taux d'AMPc contrecarrant l'effet inhibiteur de l'insuline sur l'expression du messenger de la SS (texte et flèches vertes). Ces études devraient nous permettre de confirmer la mise en jeu de la voie AMPc-dépendante d'une part, et supporter notre hypothèse que la voie MAP Kinase serait impliquée dans l'activation de ces enzymes d'autre part.



3- Etudier le niveau transcriptionnel du promoteur du gène de la somatostatine par transfection transitoire des cellules RIN-14B.

Nous possédons dans le laboratoire un plasmide contenant 1.5 kb du promoteur du gène de la SS couplé au gène rapporteur de l'enzyme chloremphénicol-acétyl-transférase (CAT). Il nous a généreusement été donné par le Dr Bernard Peers (Peers et al., 1995).

Avec cet outil, il serait intéressant de confirmer toutes nos études précédentes quant au rôle négatif de l'insuline sur la transactivation du gène de la SS par le dosage de l'activité CAT des cellules transfectées avec le plasmide, à savoir ses effets en fonction du temps et de la concentration d'insuline.

Une mutagenèse de l'élément de réponse CRE du promoteur permettrait également de confirmer l'implication d'une voie AMPc-dépendante empruntée par l'insuline pour contrôler le gène de la SS.

L'ensemble de ces recherches devrait normalement aider à dresser un schéma linéaire du signal insulinique responsable de l'inhibition de l'expression du messenger de la SS pancréatique. Cependant, il existe des cellules delta à SS dans l'estomac qui subissent les mêmes changements métaboliques que les cellules delta pancréatiques au cours du diabète à savoir l'augmentation de l'expression du messenger et des contenus en SS (Patel et al., 1976; Orci et al., 1976). Il serait utile de refaire toute notre étude à partir de cellules gastriques à SS afin de mettre en évidence un mécanisme consensus de l'insuline sur l'expression de la SS.

VII- REMERCIEMENTS

Voici venu le temps de l'exercice des remerciements. Peut-être est-ce le plus difficile dans une thèse !

Cher Dr Morisset, tout d'abord, merci de m'avoir accueillie dans votre laboratoire. J'ai l'impression que c'était hier le jour où nous nous sommes rencontrés pour la première fois à Paris, le 10 octobre 2000, je crois. Depuis, ouh là là...!!! Je me suis toujours efforcée de faire de mon mieux. Même si je n'ai jamais eu « la petite tape dans le dos » durant ces 3 ans et demi qui encourage l'étudiant, et qui signifie que le professeur est content de son élève, je vous remercie cependant de cette formation à la dure. Elle m'a permis de connaître mes limites, de toujours persévérer, et surtout d'accomplir ce travail le plus justement possible. Votre compétence et votre grande disponibilité m'auront permis de surmonter bien des difficultés. Soyez assuré de ma reconnaissance.

Je souhaite exprimer toute ma gratitude envers les membres du jury qui ont bien voulu consacrer à ma thèse une partie de leur temps extrêmement précieux : Dr André Carpentier, Dr Murray Korc et le Dr Claude Asselin.

Je voudrais remercier le Dr Claude Asselin qui m'a toujours accordé de son précieux temps pour répondre à mes questions. Ses suggestions et conseils judicieux ont toujours été d'un grand secours pour l'avancement de mon travail. Merci aussi pour vos encouragements et votre soutien.

Je voudrais exprimer toute ma reconnaissance et mon amitié pour le Dr Nathalie Rivard. Nathalie, tu as été pour moi comme une deuxième maman à une période très noire de ma vie que j'ai surmontée grâce à toi en grande partie, loin de ma famille. Je n'oublierai jamais. Ton soutien, tes encouragements, tes conseils et aussi tes critiques m'ont aidée à grandir d'un point de vue personnel. Tes compétences scientifiques et ta grande disponibilité du côté professionnel m'ont beaucoup aidée dans l'accomplissement de cette thèse. Merci Nathalie !

Je remercie aussi profondément Jean Lainé pour sa coopération et l'aide précieuse qu'il m'a apportée pour ce travail. Jean, tu es un assistant de recherche remarquable, tu as la réponse à tous les problèmes. Ton enthousiasme m'a permis de surmonter bien des moments difficiles au cours de ces trois ans et demi. Merci de ton réconfort et de ton écoute.

J'adresse aussi mes vifs remerciements à tous ceux et celles qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail. Je suis sûre qu'ils se reconnaîtront.

Merci aux personnes qui m'ont témoigné leur sympathie au cours de ces années, je pense à Marie-Josée, Laetitia, Anne, Marie-Pierre, Claudine, Eva, Mylène, Jean-François (lâche pas !), Hugo, Mirna, Jim (prononcer D'Gym!), Sébastien, Isabelle, Fernand-Pierre, Mathieu, Johnny.

Malgré l'Océan qui nous sépare, mes deux sœurs, Sabine et Sandrine ont été les témoins de mes joies, de mes fatigues, de mes enthousiasmes, de mes hauts et des mes....bas. Merci les doudounes et ça va continuer comme ça....

Merci à papa et maman dont les encouragements, les conseils, les mises en garde et la générosité sont inestimables et leur bravoure exceptionnelle pour endurer une cadette de mon genre !!!

Finalement, pour toi mon Rami... bala wala shi.

VIII- REFERENCES

Aguila MC, Dees WL, Haensly WE, McCann SM. 1991. Evidence that somatostatin is localized and synthesized in lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88:11485-11489.

Amherdt M, Patel YC, Orci L. 1987. Selective binding of somatostatin-14 and somatostatin-28 to islet cells revealed by quantitative electron microscopic autoradiography. *J Clin Invest*. 80:1455-1458.

Ariznavarreta C, Fernandez-Durango R. 1987. Influence of streptozotocin-induced diabetes on the concentration of immunoreactive somatostatin in the retina and peripheral blood of the rat: effect of insulin treatment. *J Endocrinol*. 114:363-367.

Banting FG, Best CH, Collip JB, Campbell WR, Fletcher AA. 1922. Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus: preliminary report. *CMAJ*. 145: 1281-1286.

Banting FG, Best CH. Pancreatic extracts. 1922. *J Lab Clin Med*. 115: 254-272.

Beinfeld MC, Bourdais J, Kuks P, Morel A, Cohen P. 1989. Characterization of an endoprotease from rat small intestinal mucosal secretory granules which generates somatostatin-28 from prosomatostatin by cleavage after a single arginine residue. *J Biol Chem*. 264:4460-4465.

Berridge MV, Tan AS, Hilton CJ. 1993. Cyclic adenosine monophosphate promotes cell survival and retards apoptosis in a factor-dependent bone marrow-derived cell line. *Exp Hematol*. 21:269-276.

Bertuzzi F, Berra C, Socci C, Davalli AM, Calori G, Freschi M, Piemonti L, De Nittis P, Pozza G, Pontiroli AE. 1995. Glucagon improves insulin secretion from pig islets in vitro. *J Endocrinol*. 147:87-93.

Beylot M, Chayvialle JA, Rebattu B, Sautot G, Cohen R, Riou JP, Mornex R. 1986. Regulation of peripheral plasma somatostatin like immunoreactivity in type I diabetes: role of the degree of metabolic control. *Diabete Metab.* 12:39-44.

Bhathena SJ, Awoke S, Voyles NR, Wilkins SD, Recant L, Oie HK, Gazdar AF. 1984. Insulin, glucagon, and somatostatin secretion by cultured rat islet cell tumor and its clones. *Proc Soc Exp Biol Med.* 175:35-38.

Bjork E, Berne C, Karlsson FA. 1998. Induction of beta-cell rest in type 1 diabetes. Studies on the effects of octreotide and diazoxide. *Diabetes Care.* 21:427-430.

Blakesley VA, Butler AA, Koval AP, Okubo Y, LeRoith D. 1999. In: Rosenfeld RG, Roberts CT, Jr., editors. *The IGF system.* Totowa, NJ: Humana Press Inc. p 329-353.

Bocian-Sobkowska J, Zabel M, Wozniak W, Surdyk-Zasada J. 1997. Prenatal development of the human pancreatic islets. Immunocytochemical identification of insulin-, glucagon-, somatostatin- and pancreatic polypeptide-containing cells. *Folia Histochem Cytobiol.* 35:151-154.

Bonner-Weir S, Orci L. 1982. New perspectives on the microvasculature of the islets of Langerhans in the rat. *Diabetes.* 31:883-889.

Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, Brack N, Lazar N, Panchal M, Allemandou F, Boileau G, Cohen P, Rholam M. 2002. The somatostatin-28(1-12)-NPAMAP sequence: an essential helical-promoting motif governing prosomatostatin processing at mono- and dibasic sites. *Biochemistry.* 41:1630-1639.

- Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R. 1973. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science*. 179:77-79.
- Brimnes MK, Jensen T, Jorgensen TN, Michelsen BK, Troelsen J, Werdelin O. 2002. Low expression of insulin in the thymus of non-obese diabetic mice. *J Autoimmun*. 19:203-213.
- Brown M, Rivier J, Vale W. 1981. Somatostatin-28: selective action on the pancreatic beta-cell and brain. *Endocrinology*. 108:2391-2396.
- Cejvan K, Coy DH, Efendic S. 2003. Intra-islet somatostatin regulates glucagon release via type 2 somatostatin receptors in rats. *Diabetes*. 52:1176-1181.
- Chemineau P., Blanc M., Caraty A., Bruneau G., Monget P., 1999. Sous-nutrition, reproduction et système nerveux central chez les mammifères : rôle de la leptine. *INRA Prod. Anim.*, 12 :217-223.
- Chevenne D, Trivin F, Porquet D. 1999. Insulin assays and reference values. *Diabetes metab*. 25:459-476.
- Chiba T, Kadowaki S, Taminato T, Chihara K, Seino Y, Matsukura S, Fujita T. 1981. Effect of antisomatostatin gamma-globulin on gastrin release in rats. *Gastroenterology*. 81:321-326.
- Chiba T, Park J, Yamada T. 1988. Biosynthesis of somatostatin in canine fundic D cells. *J Clin Invest*. 81:282-287.
- Clark A, Grant AM. 1983. Quantitative morphology of endocrine cells in human fetal pancreas. *Diabetologia*. 25:31-35.
- Conlon JM, Tostivint H, Vaudry H. 1997. Somatostatin- and urotensin II-related peptides: molecular diversity and evolutionary perspectives. *Regul Pept*. 9:95-103.

Corvera S and Czech MP. 1998. Direct targets of phosphoinositide 3-kinase products in membrane traffic and signal transduction. *Trends in Cell Biol.* 8:442-446.

Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature.* 378:785-789.

D'Alessio DA, Sieber C, Beglinger C, Ensink JW. 1989. A physiologic role for somatostatin 28 as a regulator of insulin secretion. *J Clin Invest.* 84:857-862.

De Krijger RR, Aanstoot HJ, Kranenburg G, Reinhard M, Visser WJ, Bruining GJ. 1992. The midgestational human fetal pancreas contains cells coexpressing islet hormones. *Dev Biol.* 153:368-375.

de Lecea L, Criado JR, Prospero-Garcia O, Gautvik KM, Schweitzer P, Danielson PE, Dunlop CL, Siggins GR, Henriksen SJ, Sutcliffe JG. 1996. A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. *Nature.* 381:242-245.

de Lecea L, del Rio JA, Criado JR, Alcantara S, Morales M, Danielson PE, Henriksen SJ, Soriano E, Sutcliffe JG. 1997. Cortistatin is expressed in a distinct subset of cortical interneurons. *J Neurosci.* 17:5868-5880.

Dembinski A, Warzecha Z, Konturek SJ, Schally AV. 1987. Effect of somatostatin on the growth of gastrointestinal mucosa and pancreas in rats. Role of endogenous gastrin. *Gut.* 28:227-232.

DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH, Yancopoulos GD. 1991. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell.* 65:663-675.

Devendra D, Liu E, Eisenbarth GS, 2004. Type 1 diabetes: recent developments. *Clin Rev* 328:750-754.

Dinneen S, Alzaid A, Turk D, Rizza R. 1995. Failure of glucagon suppression contributes to postprandial hyperglycaemia in IDDM. *Diabetologia*. 38:337-343.

Domschke S, Bloom SR, Adrian TE, Lux G, Domschke W. 1988. Chronic pancreatitis and diabetes mellitus: plasma and gastroduodenal mucosal profiles of regulatory peptides (gastrin, motilin, secretin, cholecystokinin, gastric inhibitory polypeptide, somatostatin, VIP, substance P, pancreatic polypeptide, glucagon, enteroglucagon, neurotensin). *Hepatogastroenterology*. 35:229-237.

Dubois MP. 1975. Immunoreactive somatostatin is present in discrete cells of the endocrine pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 72:1340-1343.

Ducruzeau PH, Fletcher LM, Vidal H, Laville M, Tavaré JM. 2002. Molecular mechanisms of insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes. *Diabetes Metab*. 28:85-92.

Dutta S, Gannon M, Peers B, Wright C, Bonner-Weir S, Montminy M. 2001. PDX:PBX complexes are required for normal proliferation of pancreatic cells during development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:1065-1070.

Edlund H. 1998. Transcribing pancreas. *Diabetes* 47:1817-1823.

Edlund H. 2001. Developmental biology of the pancreas. *Diabetes*. 50:S5-S9.

Ehrman MM, Melroe GT, Kittilson JD, Sheridan MA. 2004. Glucose-stimulated somatostatin gene expression in the brockmann bodies of rainbow trout results from increased mRNA transcription and not from altered mRNA stability. *Zool Sci*. 21:87-91.

Eilertson CD, Kittilson JD, Sheridan MA. 1995. Effects of insulin, glucagon, and somatostatin on the release of somatostatin-25 and somatostatin-14 from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, pancreatic islets in vitro. *Gen Comp Endocrinol*. 99:211-220.

Ensink JW, Laschansky EC, Vogel RE, Simonowitz DA, Roos BA, Francis BH. 1989. Circulating prosomatostatin-derived peptides. Differential responses to food ingestion. *J Clin Invest.* 83:1580-1589.

Ensink JW, Vogel RE, Laschansky EC, Francis BH. 1990. Effect of ingested carbohydrate, fat, and protein on the release of somatostatin-28 in humans. *Gastroenterology.* 98:633-638.

Ensink JW, Vogel RE, Laschansky EC, Koerker DJ, Prigeon RL, Kahn SE, D'Alessio DA. 1997. Endogenous somatostatin-28 modulates postprandial insulin secretion. Immunoneutralization studies in baboons. *J Clin Invest.* 100:2295-2302.

Epelbaum J. 1986. Somatostatin in the central nervous system: physiology and pathological modifications. *Prog Neurobiol.* 27:63-100.

Esch F, Bohlen P, Ling N, Benoit R, Brazeau P, Guillemin R. 1980. Primary structure of ovine hypothalamic somatostatin-28 and somatostatin-25. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77:6827-6831.

Ferreira IA, Eybrechts KL, Mocking AI, Kroner C, Akkerman JW. 2004. IRS-1 mediates inhibition of Ca²⁺ mobilization by insulin via the inhibitory G-protein Gi. *J Biol Chem.* 279:3254-3264.

Finley JC, Maderdrut JL, Roger LJ, Petrusz P. 1981. The immunocytochemical localization of somatostatin-containing neurons in the rat central nervous system. *Neuroscience.* 6:2173-2192.

Fowden AL and Hill DJ. 2001. Intra-uterine programming of the endocrine pancreas. *Brit Med Bull.* 60:123-142.

Francis BH, Baskin DG, Saunders DR, Ensink JW. 1990. Distribution of somatostatin-14 and somatostatin-28 gastrointestinal-pancreatic cells of rats and humans. *Gastroenterology.* 99:1283-1291.

- Fujii S. 1979. Development of pancreatic endocrine cells in the rat fetus. *Arch Histol Jpn.* 42:467-479.
- Fuller PJ, Verity K. 1989. Somatostatin gene expression in the thymus gland. *J Immunol.* 143:1015-1017.
- Gaber AO, Fraga DW, Callicutt CS, Gerling IC, Sabek OM, Kotb MY. 2001. Improved in vivo pancreatic islet function after prolonged in vitro islet culture. *Transplantation.* 72:1730-1736.
- Gaulton GN, Schwartz JL, Eardley DD. 1985. Assessment of the diabetogenic drugs alloxan and streptozotocin as models for the study of immune defects in diabetic mice. *Diabetologia.* 28:769-775.
- Gazdar AF, Chick WL, Oie HK, Sims HL, King DL, Weir GC, Lauris V. 1980. Continuous, clonal, insulin- and somatostatin-secreting cell lines established from a transplantable rat islet cell tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77:3519-3523.
- Gerber PP, Trimble ER, Wollheim CB, Renold AE. Effect of insulin on glucose- and arginine-stimulated somatostatin secretion from the isolated perfused rat pancreas. *Endocrinology* 109:279-283, 1981.
- Gittes GK, Galante PE, Hanahan D, Rutter WJ, Debas HT. 1996. Lineage-specific morphogenesis in the developing pancreas: role of mesenchymal factors. *Development.* 122:439-447.
- Gittes GK, Rutter WJ. 1992. Onset of cell-specific gene expression in the developing mouse pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1128-1132.
- Gluschkof P, Morel A, Gomez S, Nicolas P, Fahy C, Cohen P. 1984. Enzymes processing somatostatin precursors: an Arg-Lys esterolase from the rat brain cortex converting somatostatin-28 into somatostatin-14. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81:6662-6666.

Goldman H, Wong I, Patel YC. 1982. A study of the structural and biochemical development of human fetal islets of Langerhans. *Diabetes*. 31:897-902.

Goudet G, Delhalle S, Biemar F, Martial JA, Peers B. 1999. Functional and cooperative interactions between the homeodomain PDX1, Pbx, and Prep1 factors on the somatostatin promoter. *J Biol Chem*. 274:4067-4073.

Gutkind JS. 1998. Cell growth control by G protein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration. *Oncogene*. 17:1331-1342.

Guz Y, Montminy MR, Stein R, Leonard J, Gamer LW, Wright CV, Teitelman G. 1995. Expression of murine STF-1, a putative insulin gene transcription factor, in beta cells of pancreas, duodenal epithelium and pancreatic exocrine and endocrine progenitors during ontogeny. *Development*. 121:11-18.

Harty RF, Maico DG, McGuigan JE. 1981. Somatostatin inhibition of basal and carbachol-stimulated gastrin release in rat antral organ culture. *Gastroenterology*. 81:707-712.

Hasegawa M, Tang Y, Osawa H, Onuma H, Nishimiya T, Ochi M, Terauchi Y, Kadowaki T, Makino H. 2002. Differential regulation of gene expression and insulin-induced activation of phosphodiesterase 3B in adipocytes of lean insulin-resistant IRS-1 (-/-) mice. *Diabetes Res Clin Pract*. 58:79-85.

Hebrok M, Kim SK, Melton DA. 1998. Notochord repression of endodermal Sonic Hedgehog permits pancreas development. *Genes Dev*. 12:1705-1713.

Hildebrand P, Ensink JW, Gyr K, Mossi S, Leuppi J, Eggenberger C, Beglinger C. 1992. Evidence for hormonal inhibition of exocrine pancreatic function by somatostatin 28 in humans. *Gastroenterology*. 103:240-247.

- Hoftiezer V, Carpenter AM. 1973. Comparison of streptozotocin and alloxan-induced diabetes in the rat, including volumetric quantitation of the pancreatic islets. *Diabetologia*. 9:178-184.
- Holman GD and Kasuga M. 1997. From receptor to transporter: insulin signalling to glucose transport. *Diabetologia*. 40:991-1003.
- Honey RN, Weir GC. 1979. Insulin stimulates somatostatin and inhibits glucagon secretion from the perfused chicken pancreas-duodenum. *Life Sci* 24:1747-1750.
- Hong EG, Noh HL, Lee SK, Chung YS, Lee KW, Kim HM. 2002. Insulin and Glucagon Secretions, and Morphological Change of Pancreatic Islets in OLETF Rats, a Model of Type 2 Diabetes Mellitus. *J Kor med Sci*. 17: 34-40.
- Hunter T, Karin M. 1992. The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell*. 70:375-387.
- Ilieva A, Yuan S, Wang R, Duguid WP, Rosenberg L. 1999a. The structural integrity of the islet in vitro: the effect of incubation temperature. *Pancreas*. 19:297-303.
- Ilieva A, Yuan S, Wang RN, Agapitos D, Hill DJ, Rosenberg L. 1999b. Pancreatic islet cell survival following islet isolation: the role of cellular interactions in the pancreas. *J Endocrinol*. 161:357-364.
- Islas-Andrade S, Revilla MC, Escobedo de la Pena J, Polanco AC, Palomino MA, Velasco AF. 2000. Streptozotocin and alloxan in experimental diabetes : comparison of the two models in rats. *Acta Histochem Cytochem* 33:201-208.
- Itoh M, Mandarino L, Gerich JE. 1980. Antisomatostatin gamma globulin augments secretion of both insulin and glucagon in vitro: evidence for a physiologic role for endogenous somatostatin in the regulation of pancreatic A- and B-cell function. *Diabetes*. 29:693-696.

Jansson L and Carlsson PO. 2002. Graft vascular function after transplantation of pancreatic islets. *Diabetologia*. 45:749-763.

Jarrousse C, Bataille D, Jeanrenaud B. 1984. A pure enteroglucagon, oxyntomodulin (glucagon 37), stimulates insulin release in perfused rat pancreas. *Endocrinology*. 115:102-105.

Jiang G, Zhang BB. 2003. Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 284:E671-E678.

Johansson O, Hokfelt T, Elde RP. 1984. Immunohistochemical distribution of somatostatin-like immunoreactivity in the central nervous system of the adult rat. *Neuroscience*. 13:265-339.

Jones CW, Reynolds WA, Hoganson GE. 1980. Streptozotocin diabetes in the monkey: plasma levels of glucose, insulin, glucagon, and somatostatin, with corresponding morphometric analysis of islet endocrine cells. *Diabetes*. 29:536-546.

Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund E. 1994. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature*. 371:606-609.

Kadowaki S, Taminato T, Chiba T, Goto Y, Nozawa M, Seino Y, Matsukura S, Fujita T. 1980. Reversal of the enhanced somatostatin release from the isolated, perfused diabetic rat pancreas after the amelioration of diabetes by whole pancreas transplantation. *Diabetes*. 29:742-746.

Karlsson O, Thor S, Norberg T, Ohlsson H, Edlund T. 1990. Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain. *Nature*. 44:879-882.

Kaung HL. 1994. Growth dynamics of pancreatic islet cell populations during fetal and neonatal development of the rat. *Dev Dyn*. 200:163-175.

Keast JR, Furness JB, Costa M. 1984. Somatostatin in human enteric nerves. Distribution and characterization. *Cell Tissue Res.* 237:299-308.

Kemp DM, Thomas MK, Habener JF. 2003. Developmental aspects of the endocrine pancreas. *Rev Endocr Metab Disord.* 4 :5-17.

Kido Y, Nakae J, Accili D. 2001. The insulin receptor and its cellular targets. *J Clin Endocr Metab.* 86:972-979.

Kikutsuji T, Harada M, Tashiro S, Ii S, Moritani M, Yamaoka T, Itakura M. 2000. Expression of somatostatin receptor subtypes and growth inhibition in human exocrine pancreatic cancers. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 7:496-503.

Kim SK, Hebrok M. 2001. Intercellular signals regulating pancreas development and function. *Gene Dev.* 15:111-127.

Kim YB, Nikoulina SE, Ciaraldi TP, Henry RR, Kahn BB. 1999. Normal insulin-dependent activation of Akt/protein kinase B, with diminished activation of phosphoinositide 3-kinase, in muscle in type 2 diabetes. *J Clin Invest.* 104-733-741.

King JA, Millar RP. 1979. Phylogenetic and anatomical distribution of somatostatin in vertebrates. *Endocrinology.* 105:1322-1329.

Kirwan JP and del Aguila LF. 2003. Insulin signalling, exercise and cellular integrity. *Biochem Soc Trans.* 31:1281-1285.

Kitamura T, Kitamura Y, Kuroda S, Hino Y, Ando M, Kotani K, Konishi H, Matsuzaki H, Kikkawa U, Ogawa W, Kasuga M. 1999. Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt. *Mol Cell Biol.* 19:6286-6296.

Klaff LJ, Barron JL, Levitt NS, Ling N, Millar RP. 1983. Inhibition of pancreatic hormone secretion by somatostatin-28 and somatostatin-14 in man. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 104:91-95.

Kleinman R, Gingerich R, Ohning G, Wong H, Olthoff K, Walsh J, Brunnicardi FC. 1995. The influence of somatostatin on glucagon and pancreatic polypeptide secretion in the isolated perfused human pancreas. *Int J Pancreatol*. 18:51-57.

Kojima H, Fujimiya M, Matsumura K, Nakahara T, Hara M, Chan L. 2004. Extrapancreatic insulin-producing cells in multiple organs in diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:2458-2463.

Komatsu S, Yamamoto M, Arishima K, Eguchi Y. 1997. Ontogeny of somatostatin cells in the rat fetal pancreas. *J Vet Med Sci* 59:1165-1166.

Korc M. 2003. Diabetes mellitus in the era of proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2:399-404.

Kreuzer J, Nurnberg B, Krieger-Brauer HI. 2004. Ligand-dependent autophosphorylation of the insulin receptor is positively regulated by Gi-proteins. *Biochem J*. (Sous presse).

Kulkarni RN. 2002. Receptors for insulin and insulin-like growth factor-I and insulin receptor substrate-I mediate pathways that regulate islet function. *Biochem Soc Trans*. 30:317-322.

Kwok RP, Lundblad JR, Chrivia JC, Richards JP, Bachinger HP, Brennan RG, Roberts SG, Green MR, Goodman RH. 1994. Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature*. 370:223-226.

Langerhans P. 1937. Contributions to the microscopic anatomy of the pancreas. *Bull Int History Med*. 5:1-39.

Larsson LI, Goltermann N, de Magistris L, Rehfeld JF, Schwartz TW. 1979. Somatostatin cell processes as pathways for paracrine secretion. *Science*. 205:1393-1395.

Larsson LI, Sundler F, Hakanson R. 1976. Pancreatic polypeptide - a postulated new hormone: identification of its cellular storage site by light and electron microscopic immunocytochemistry. *Diabetologia*. 12:211-226.

Larsson LI. 1979. Innervation of the pancreas by substance P, enkephalin, vasoactive intestinal polypeptide and gastrin/CCK immunoreactive nerves. *J Histochem Cytochem*. 27:1283-1284.

Lawrence JC Jr, Abraham RT. 1997. PHAS/4E-BPs as regulators of mRNA translation and cell proliferation. *Trends Biochem Sci*. 22:345-349.

Leduque P, Gespach C, Brown JC, Rosselin G, Dubois PM. 1982. Ontogeny of gastric inhibitory peptide in the human gastro-intestinal tract and endocrine pancreas. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 99:112-121.

Leonard J, Peers B, Johnson T, Ferreri K, Lee S, Montminy MR. 1993. Characterization of somatostatin transactivating factor-1, a novel homeobox factor that stimulates somatostatin expression in pancreatic islet cells. *Mol Endocrinol*. 7:1275-1283.

Leonard J, Serup P, Gonzalez G, Edlund T, Montminy M. 1992. The LIM family transcription factor Isl-1 requires cAMP response element binding protein to promote somatostatin expression in pancreatic islet cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:6247-6251.

Levy P. 1998. Dans : Exploration de la sécrétion pancréatique exocrine. Distribué par les laboratoires Parke-Davis.

Liu Y, Guth PH, Kaneko K, Livingston EH, Brunicardi FC. 1993. Dynamic in vivo observation of rat islet microcirculation. *Pancreas*. 8:15-21.

Lizcano JM, Morrice N, Cohen P. 2000. Regulation of BAD by cAMP-dependent protein kinase is mediated via phosphorylation of a novel site, Ser155. *Biochem J.* 349:547-557.

Londos C, Honnor RC, Dhillon GS. 1985. cAMP-dependent protein kinase and lipolysis in rat adipocytes. III. Multiple modes of insulin regulation of lipolysis and regulation of insulin responses by adenylate cyclase regulators. *J Biol Chem.* 260:15139-15145.

Lopaczynski W. 1999. Differential regulation of signaling pathways for insulin and insulin-like growth factor I. *Acta Biochim Pol.* 46:51-60.

Luft FC. 1997. G-proteins and insulin signaling. *J Mol Med.* 75:233-235.

MacKenzie SJ, Baillie GS, McPhee I, Bolger GB, Houslay MD. ERK2 mitogen-activated protein kinase binding, phosphorylation, and regulation of the PDE4D cAMP-specific phosphodiesterases. The involvement of COOH-terminal docking sites and NH2-terminal UCR regions. *J Biol Chem* 275:16609-16617, 2000.

Mandarino L, Stenner D, Blanchard W, Nissen S, Gerich J, Ling N, Brazeau P, Bohlen P, Esch F, Guillemin R. 1981. Selective effects of somatostatin-14, -25 and -28 on in vitro insulin and glucagon secretion. *Nature.* 291:76-77.

Mandrup-Poulsen T. 1998. Diabetes. *BMJ.* 316:1221-1225.

Maruyama H, Hisatomi A, Orci L, Grodsky GM, Unger RH. 1984. Insulin within islets is a physiologic glucagon release inhibitor. *J Clin Invest.* 74:2296-2299.

Matsushita K, Okabayashi Y, Hasegawa H, Koide M, Kido Y, Okutani T, Sugimoto Y, Kasuga M. 1993. In vitro inhibitory effect of somatostatin on secretin action in exocrine pancreas of rats. *Gastroenterology.* 104:1146-1152.

Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Tanaka K, Fukamizu A. 2003. Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo 1) targets to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 20:11285-11290.

McEvoy RC, Madson KL. 1980a. Pancreatic insulin-, glucagon-, and somatostatin-positive islet cell populations during the perinatal development of the rat. I. Morphometric quantitation. *Biol Neonate*. 38:248-254.

McEvoy RC, Madson KL. 1980b. Pancreatic insulin-, glucagon-, and somatostatin-positive islet cell populations during the perinatal development of the rat. II. Changes in hormone content and concentration. *Biol Neonate*. 38:255-259.

Miller CP, McGehee RE Jr, Habener JF. 1994. IDX-1: a new homeodomain transcription factor expressed in rat pancreatic islets and duodenum that transactivates the somatostatin gene. *EMBO J*. 13:1145-1156.

Montminy MR, Goodman RH, Horovitch SJ, Habener JF. 1984. Primary structure of the gene encoding rat preprosomatostatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 81:3337-3340.

Montminy MR, Sevarino KA, Wagner JA, Mandel G, Goodman RH. 1986. Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83:6682-6686.

Moore CA, Kittilson JD, Ehrman MM, Sheridan MA. 1999. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) possess two somatostatin mRNAs that are differentially expressed. *Am J Physiol*. 277:R1553-1561.

Morisset J. 1984. Somatostatin: a potential antigrowth factor for the exocrine pancreas. *Regul Pept*. 10:11-22.

Murakami K, Taniguchi H, Tamagawa M, Ejiri K, Baba S. 1982. Modulation of somatostatin release by endogenous glucagon and insulin: physiological relationship between A, B and D cells in rat pancreatic islets. *Endocrinol Jpn*. 29:503-508.

Murray-Rust J, McLeod AN, Blundell TL, Wood SP. 1992. Structure and evolution of insulins: implications for receptor binding. *Bioessays*. 14:325-331.

Murtaugh CL and Melton DA. 2003. Genes, Signals and lineages in pancreas development. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 19:71-89.

Nakagawa A, Stagner JI, Samols E. 1995. In situ binding of islet hormones in the isolated perfused rat pancreas: evidence for local high concentrations of islet hormones via the islet-acinar axis. *Diabetologia* 38:262-268.

Oberholzer J, Toso C, Benhamou PY, Becker C, Martin PY, Philippe J, Morel P. 2001. La transplantation d'îlots de Langerhans pour le traitement du diabète. *Swiss Med Wkly* 82: 390-394.

O'Brien RM, Houslay MD, Milligan G, Siddle K. 1987. The insulin receptor tyrosyl kinase phosphorylates holomeric forms of the guanine nucleotide regulatory proteins Gi and Go. *FEBS Lett*. 212:281-288.

Offield MF, Jetton TL, Labosky PA, Ray M, Stein RW, Magnuson MA, Hogan BL, Wright CV. 1996. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development*. 122:983-995.

Ohlsson H, Karlsson K, Edlund T. 1993. IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. *EMBO J*. 12:4251-4259.

Okamoto T, Nishimoto I. 1991. Analysis of stimulation-G protein subunit coupling by using active insulin-like growth factor II receptor peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88:8020-8023.

Patel YC, Reichlin S. 1978. Somatostatin in hypothalamus, extrahypothalamic brain, and peripheral tissues of the rat. *Endocrinology*. 102:523-530.

Patel YC, Srikant CB. 1994. Subtype selectivity of peptide analogs for all five cloned human somatostatin receptors (hsstr 1-5). *Endocrinology*. 135:2814-2817.

Patel YC, Wheatley T, Ning C. 1981. Multiple forms of immunoreactive somatostatin: comparison of distribution in neural and non neural tissues and portal plasma of the rat. *Endocrinology*. 109:1943-1949.

Patel YC. 1983. A high molecular weight form of somatostatin-28 (1-12)-like immunoreactive substance without somatostatin-14 immunoreactivity in the rat pancreas. Evidence that somatostatin-14 synthesis can occur independently of somatostatin-28. *J Clin Invest*. 72:2137-2143.

Patel YC. 1999. Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol*. 20:157-198.

Paulin C, Dubois PM. 1978. Immunohistochemical identification and localization of pancreatic polypeptide cells in the pancreas and gastrointestinal tract of the human fetus and adult man. *Cell Tissue Res*. 188:251-257.

Peers B, Sharma S, Johnson T, Kamps M, Montminy M. 1995. The pancreatic islet factor STF-1 binds cooperatively with Pbx to a regulatory element in the somatostatin promoter: importance of the FPWMK motif and of the homeodomain. *Mol Cell Biol*. 15:7091-7097.

Penman E, Wass JA, Butler MG, Penny ES, Price J, Wu P, Rees LH. 1983. Distribution and characterisation of immunoreactive somatostatin in human gastrointestinal tract. *Regul Pept*. 7:53-65.

Perczak-Dudkowska B, Niewiedziol B. 1984. Exocrine function of the pancreas in juvenile onset diabetes mellitus. II. Lipase and pancreatic amylase activity (concentration) and secretion of enzymatic protein. *Pediatr Pol*. 59:613-622.

Pertseva MN, Plesneva SA, Shpakov AO, Rusakov YuI, Kuznetsova LA. 1995. Involvement of the adenylyl cyclase signaling system in the action of insulin and

mollusk insulin-like peptide. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 112:689-695.

Pertseva MN, Shpakov AO, Plesneva SA, Kuznetsova LA. 2003. A novel view on the mechanisms of action of insulin and other insulin superfamily peptides: involvement of adenylyl cyclase signaling system. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 134:11-36.

Perz M and Torlinska T. 2001. Insulin receptor- structural and functional characteristics. *Med Sci Moni.* 7:169-177.

Peters J, Jurgensen A, Kloppel G. 2000. Ontogeny, differentiation and growth of the endocrine pancreas. *Virchows Arch.* 436:527-538.

Polak M, Bouchareb-Banaei L, Scharfmann R, Czernichow P. 2000. Early pattern of differentiation in the human pancreas. *Diabetes.* 49:225-232.

Polychronakos C. 2004. Animal models of spontaneous autoimmune diabetes: notes on their relevance to the human disease. *Curr Diab Rep.* 4:151-154.

Pradayrol L, Jornvall H, Mutt V, Ribet A. 1980. N-terminally extended somatostatin: the primary structure of somatostatin-28. *FEBS Lett.* 109:55-58.

Rahier J, Wallon J, Henquin JC. 1980. Abundance of somatostatin cells in the human neonatal pancreas. *Diabetologia.* 18:251-254.

Rahn T, Ronnstrand L, Leroy MJ, Wernstedt C, Tornqvist H, Manganiello VC, Belfrage P, Degerman E. 1996. Identification of the site in the cGMP-inhibited phosphodiesterase phosphorylated in adipocytes in response to insulin and isoproterenol. *J Biol Chem.* 271:11575-11580.

Ramanathan S, Poussier P. 2001. BB rat lyp mutation and Type 1 diabetes. *Immunol Rev.* 184:161-171.

- Reaven GM, Chen YD, Hollenbeck CB, Sheu WH, Ostrega D, Polonsky KS. 1993. Plasma insulin, C-peptide, and proinsulin concentrations in obese and nonobese individuals with varying degrees of glucose tolerance. *J Clin Endocrinol Metab.* 76:44-48.
- Reichlin S. 1983. Somatostatin (second of two parts). *N Engl J Med.* 309:1556-1563.
- Reubi JC, Rivier J, Perrin M, Brown M, Vale W. 1982. Specific high affinity binding sites for somatostatin-28 on pancreatic beta-cells: differences with brain somatostatin receptors. *Endocrinology.* 110:1049-1051.
- Rivard N, Guan D, Turkelson CM, Petitclerc D, Solomon TE, Morisset J. 1991. Negative control by Sandostatin on pancreatic and duodenal growth: a possible implication of insulin-like growth factor I. *Regul Pept.* 34:13-23.
- Roep BO, Atkinson MA, van Endert PM, Gottlieb PA, Wilson SB, Sachs JA. 1999. Autoreactive T cell responses in insulin-dependent (Type 1) diabetes mellitus. Report of the first international workshop for standardization of T cell assays. *J Autoimmun.* 13:267-282.
- Rossowski WJ, Gu ZF, Akarca US, Jensen RT, Coy DH. Characterization of somatostatin receptor subtypes controlling rat gastric acid and pancreatic amylase release. *Peptides.* 1994;15(8):1421-4.
- Saltiel AR and Kahn CR. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 414:799-806.
- Saltiel AR and Pessin JE. 2002. Insulin signalling pathways in time and space. *Trends in Cell Biology.* 12:65-71.
- Samols E et Stagnier JJ. 1991. Intra-islet and islet-acinar portal system and their significance. *In Comprehensive endocrinology :the endocrine pancreas.* E Samols, editor. Raven Press, Ltd., New York. 93-124.

Sanchez-Margalet V, Gonzalez-Yanes C, Santos-Alvarez J, Najib S. 1999. Insulin activates G alpha il,2 protein in rat hepatoma (HTC) cell membranes. *Cell Mol Life Sci.* 55 :142-147.

Saudek F, Cihalova E, Karasova L, Kobylka P, Lomsky R. 1999. Increased glucagon-stimulated insulin secretion of cryopreserved rat islets transplanted into nude mice. *J Mol Med.* 77:107-110.

Scharfmann R. 2000. Control of early development of the pancreas in rodents and humans: implications of signals from the mesenchyme. *Diabetologia.* 43:1083-1092.

Schettini G, Florio T, Magri G, Grimaldi M, Meucci O, Landolfi E, Marino A. 1988. Somatostatin and SMS 201-995 reverse the impairment of cognitive functions induced by cysteamine depletion of brain somatostatin. *Eur J Pharmacol.* 151:399-407.

Schuit FC, Derde MP, Pipeleers DG. 1989. Sensitivity of rat pancreatic A and B cells to somatostatin. *Diabetologia.* 32:207-212.

Schwartz TW. 1986. The processing of peptide precursors. 'Proline-directed arginyl cleavage' and other monobasic processing mechanisms. *FEBS Lett.* 200:1-10.

Shen LP, Rutter WJ. 1984. Sequence of the human somatostatin I gene. *Science.* 224:168-171.

Shepherd PR, Nave BT, Siddle K. 1995. Insulin stimulation of glycogen synthesis and glycogen synthase activity is blocked by wortmannin and rapamycin in 3T3-L1 adipocytes: evidence for the involvement of phosphoinositide 3-kinase and p70 ribosomal protein-S6 kinase. *Biochem* 305:25-28.

Skare S, Dahl-Jorgensen K, Hanssen KF, Norman N. 1985. Increased peripheral venous somatostatin concentration and decreased glucagons response to arginine in

patients with insulin dependent diabetes mellitus without residual B-cell function. Increased plasma SRIF in IDDM. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 109:517-521.

Soria B, Andreu E, Berna G, Fuentes E, Gil A, Leon-Quinto T, Martin F, Montanya E, Nadal A, Reig JA, Ripoll C, Roche E, Sanchez-Andres JV, Segura J. 2000. Engineering pancreatic islets. *Pflugers Arch*. 440:1-18.

St Onge L, Wehr R, Gruss P. 1999. Pancreas development and diabetes. *Curr Opin Genet Dev*. 9:295-300.

Standaert ML, Galloway L, Karnam P, Bandyopadhyay G, Moscat J, Farese RV. 1997. Protein kinase C-zeta as a downstream effector of phosphatidylinositol 3-kinase during insulin stimulation in rat adipocytes. Potential role in glucose transport. *J Biol Chem*. 272:30075-30082.

Stefan Y, Grasso S, Perrelet A, Orci L. 1983. A quantitative immunofluorescent study of the endocrine cell populations in the developing human pancreas. *Diabetes*. 32:293-301.

Stoffers DA, Zinkin NT, Stanojevic V, Clarke WL, Habener JF. 1997. Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nat Genet*. 15:106-110.

Strowski MZ, Kohler M, Chen HY, Trumbauer ME, Li Z, Szalkowski D, Gopal-Truter S, Fisher JK, Schaeffer JM, Blake AD, Zhang BB, Wilkinson HA. 2003. Somatostatin receptor subtype 5 regulates insulin secretion and glucose homeostasis. *Mol Endocrinol*. 17:93-106.

Strowski MZ, Parmar RM, Blake AD, Schaeffer JM. 2000. Somatostatin inhibits insulin and glucagon secretion via two receptors subtypes: an in vitro study of pancreatic islets from somatostatin receptor 2 knockout mice. *Endocrinology*. 141:111-117.

Su CJ, White JW, Li WH, Luo CC, Frazier ML, Saunders GF, Chan L. 1988. Structure and evolution of somatostatin genes. *Mol Endocrinol.* 2:209-216.

Sun H, Seyer JM, Patel TB. 1995. A region in the cytosolic domain of the epidermal growth factor receptor antithetically regulates the stimulatory and inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory proteins of adenylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:2229-2233.

Szkudelski T. 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* 50:537-546.

Tellez-Inon MT, Ladenheim RG, Ulloa R, Charreau EH, Tesone M. 1987. Regulation by insulin of cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) from rat luteal cells. *Horm Metab Res.* 19:249-252.

Trent DF, Weir GC. 1981. Heterogeneity of somatostatin-like peptides in rat brain, pancreas, and gastrointestinal tract. *Endocrinology.* 108 :2033-2038.

Uchida T, Takada T, Ammori BJ, Suda K, Takahashi T. 1999. Three-dimensional reconstruction of the ventral and dorsal pancreas: a new insight into anatomy and embryonic development. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 6:176-180.

Unger RH, Orci L. 1977. Role of glucagon in diabetes. *Arch Intern Med.* 137:482-491.

Vallejo M, Penchuk L, Habener JF. 1992a. Somatostatin gene upstream enhancer element activated by a protein complex consisting of CREB, Isl-1-like, and alpha-CBF-like transcription factors. *J Biol Chem.* 267:12876-12884.

Vallejo M, Miller CP, Habener JF. 1992b. Somatostatin gene transcription regulated by a bipartite pancreatic islet D-cell-specific enhancer coupled synergetically to a cAMP response element. *J Biol Chem.* 267:12868-12875

Van Dijk MA, Voorhoeve PM, Murre C. 1993. Pbx1 is converted into a transcriptional activator upon acquiring the N-terminal region of E2A in pre-B-cell acute lymphoblastoid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:6061-6065.

Vinik AI, Gagarella TS, O'Dorisio TM, Shapiro B, Wagner L. 1981. The distribution and characterization of somatostatin-like immunoreactivity in epithelial cells, submucosa, and muscle of the rat stomach and intestine. *Endocrinology*. 109:1921-1926.

Waeber G, Gomez F, Chaubert P, Temler E, Chapuis G, Boulat O, Nicod P, Haefliger JA. 1997. In vivo and in vitro effects of somatostatin and insulin on glucagon release in a human glucagonoma. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 46:637-642.

Wang RN, Rosenberg L. 1999. Maintenance of beta-cell function and survival following islet isolation requires re-establishment of the islet-matrix relationship. *J Endocrinol*. 163:181-190.

Weber CJ, Hardy MA, Lerner RL. 1977. Tissue culture isolation and preservation of human cadaveric pancreatic islets. *Surgery*. 81:270-273.

Weir GC, Knowlton SD, Atkins RF, McKennan KX, Martin DB. 1976. Glucagon secretion from the perfused pancreas of streptozotocin-treated rats. *Diabetes*. 25:275-282.

Wells JM. 2003. Genes expressed in the developing endocrine pancreas and their importance for stem cells and diabetes research. *Diabetes Metab Res*. 19:191-201.

Wolfe MM, Jain DK, Reel GM, McGuigan JE. 1984. Effects of carbachol on gastrin and somatostatin release in rat antral tissue culture. *Gastroenterology*. 87:86-93.

Yagihashi S. 1976. Exocrine pancreas of streptozotocin-diabetes rats treated with insulin. *Tohoku J Exp Med*. 120:31-42.

Yamaoka T, Itakura M. 1999. Development of pancreatic islets (review). *Int J Mol Med*. 3:247-261.

Yeagley D, Guo S, Unterman T, Quinn PG. 2001. Gene- and activation-specific mechanisms for insulin inhibition of basal and glucocorticoid-induced insulin-like growth factor binding protein-1 and phosphoenolpyruvate carboxykinase transcription. Roles of forkhead and insulin response sequences. *J Biol Chem*. 276:33705-33710.

Yoshinari M, Daikoku S. 1982. Ontogenetic appearance of immunoreactive endocrine cells in rat pancreatic islets. *Anat Embryol (Berl)*. 165:63-70.

Zhu Z, Andrisani OM, Pot DA, Dixon JE. 1989. Purification and characterization of a 43-kDa transcription factor required for rat somatostatin gene expression. *J Biol Chem*. 264:6550-6556.